



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA

*DESARROLLO DE TABLETAS ORODISPERSABLES DE
MEMANTINA, SU DESCRIPCIÓN IN VITRO Y DESEMPEÑO
BIOFARMACÉUTICO*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A

CARLOS ADRIAN PEÑALOZA BECERRA

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA

DESARROLLO DE TABLETAS ORODISPERSABLES DE MEMANTINA, SU DESCRIPCIÓN
IN VITRO Y DESEMPEÑO BIOFARMACÉUTICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN EL CAMPO DEL CONOCIMIENTO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN
SALUD CON CAMPO DISCIPLINARIO DE FARMACOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:
CARLOS ADRIAN PEÑALOZA BECERRA

TUTOR PRINCIPAL: DOCTORA PATRICIA SEGURA MEDINA
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA, MAESTRÍA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS Y
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE
INVESTIGADORES, JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN
HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS " ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO AGOSTO 2019

Si haces el bien pensarán que es con fines egoístas; ¡No importa, haz el bien!

Si realizas tus objetivos encontrarás falsos amigos y verdaderos enemigos; ¡No importa, realízalos!

El bien que hagas, el día de mañana puede ser olvidado; ¡No importa, haz el bien!

La honestidad y la sinceridad te pueden hacer vulnerable; ¡No importa, sé franco y honesto!

Si logras ENTENDER a los demás antes de JUZGARLOS

Si logras PERDONAR al prójimo antes de CONDENARLO

Si logras HACER el BIEN a tus semejantes sin esperar RECOMPENSA
ALGUNA...

¡Entonces y sólo entonces, serás un verdadero hombre!

Por que el hombre ocupado es quien siempre tiene tiempo para todo.

La indiferencia es la venganza que el mundo se toma contra los mediocres.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Patricia Segura Medina

Tutor principal.

Por la oportunidad de enseñanza y aprendizaje, por la experiencia, por el apoyo, por la amistad. Muchas gracias.

Dr. Juan Ernesto Vásquez Vásquez

Por ser mi maestro durante ya muchos años, mi admiración y respeto, por ayudar a la creación de este proyecto, por la amistad y fraterindad. Muchas gracias.

A mis Padres y hermanas

Por el amor, cariño, confianza, respaldo, paciencia, por el apoyo eterno. Muchas gracias.

Dora Alicia

Por el amor incondicional, confianza, soporte, paciencia, comprensión, por el apoyo en las buenas y malas rachas. Muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis Padres y Hermanas

Por que gracias a ustedes hoy sumamos un logro más

A Dora Alicia

Por que compartes conmigo el mismo objetivo en la vida

A Juan Vásquez

Por que hemos demostrado la importancia de tener un amigo

Y a mis compañeros y equipo de desarrollo farmacéutico de CAFET y Pharmet, al INER y al departamento de investigación en hiperreactividad bronquial, a la Universidad Nacional Autónoma de México y gente que la conforma, a los pacientes y voluntarios sanos que participan en protocolos de investigación clínica, la evolución de la farmacología no existiría sin ustedes.

I. Contenido

I. Contenido	5
II. Abreviaturas	6
III. Sobre derechos de autor del presente manuscrito	9
IV. Resumen	10
V. Abstract	10
VI. Introducción	11
VII. Materiales y métodos	13
1. Químicos y reactivos	13
2. Formulación de las tabletas orodispersables	13
3. Pruebas de disolución	13
4. Ensayo clínico de biodisponibilidad comparada	15
5. Determinación de memantina en plasma humano	16
6. Evaluación organoléptica	17
7. Análisis estadístico	18
VIII. Resultados y discusión	20
1. Pruebas de disolución	20
2. Ensayo clínico de biodisponibilidad comparada	22
3. Evaluación organoléptica	25
IX. Conclusión	26
X. Información financiera del proyecto	27
XI. Consideraciones éticas de la investigación	27
XII. Referencias	28
XIII. Anexos	31

II. Abreviaturas

ODT	Tableta orodispersable (por sus siglas en inglés: <i>OroDispersible Tablet</i>)
ODTs	Tabletas orodispersables (por sus siglas en inglés: <i>OroDispersible Tablets</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
EMA	Agencia Europea de Medicamentos (por sus siglas en inglés: <i>European Medicines Agency</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
NOM	Norma Oficial Mexicana
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (por sus siglas en inglés: <i>High performance liquid chromatography</i>)
USP	Farmacopea de los Estados Unidos de América (por sus siglas en inglés: <i>United States Pharmacopeia</i>)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
g	gramos
ml	mililitros

l	litros
N	Newton o Normal, dependiendo si se usa para hablar de fuerza o concentración.
°C	Grados Celsius / Centígrados
µm	micrometros
EEUU	Estados Unidos de América
min	minuto
v/v	volúmen / volúmen
µl	microlitros
IMC	Índice de Masa Corporal
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
C _{máx}	Concentración plasmática máxima
T _{máx}	Tiempo desde la administración y hasta alcanzar la concentración plasmática máxima
No.	Número
h	hora
p.m.	Después de medio día
a.m.	Antes de medio día
ng	nanogramos
%	Por ciento

UPLC	Cromatografía líquida de ultra eficiencia (por sus siglas en inglés: <i>Ultra performance liquid chromatography</i>)
cm	Centímetros
CV	Coefficiente de Variación
$t_{1/2}$	Vida media de eliminación
ABC_{0-72}	Area bajo la curva de tiempo 0 a 72 h
k_e	Constante de eliminación plasmática
ANOVA	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés: <i>Analysis of variance</i>)
Desv Est	Desviación estándar
mN/m	miliNewton por metro

III. Sobre derechos de autor del presente manuscrito

Este manuscrito es una versión en español del “*author’s manuscript*” del artículo “*Development of memantine orodispersible tablets and their in vitro description and biopharmaceutical performance*” que tras proceso de revisión editorial y por pares fue acondicionado, aceptado y publicado en la revista “*International Journal of Pharmacokinetics*” en el volumen 3 (1), pags. 13 a 21 en febrero de 2018.

De ninguna manera pretende sustituir al trabajo editorial final protegido por derechos de autor bajo licencia de © 2018 Centro AF de Estudios Tecnológicos – Pharmometrica. Para consultar la versión final y protegida por derechos de autor puede consultar la dirección web <https://doi.org/10.4155/ipk-2018-0001>

Carlos Adrian Peñaloza-Becerra es el primer autor y fue el investigador principal del proyecto así como fue parte del equipo de desarrollo del Centro AF de Estudios Tecnológicos.

IV. Resumen

Son necesarios nuevos abordajes para incrementar el apego a tratamiento en los ancianos con problemas para deglutir formulaciones farmacéuticas tradicionales. Una novedosa tableta orodispersable (ODT) ha sido formulada, y su biodisponibilidad y aceptabilidad de sabor fueron evaluadas *in vivo*. Materiales y métodos: La caracterización *in vitro* de la ODT comprendió dispersión en saliva simulada previo a los ensayos de disolución en volumen limitado de medio biorrelevante. Una unidosis oral de Memantina ODT de 20 mg exhibe biodisponibilidad similar a una tableta de liberación inmediata de 20 mg en población sana en condiciones de ayuno. Resultados: Los intervalos de confianza al 90% para C_{\max} fueron de 96.78-106.52% y 98.27-104.78% para AUC_{0-72} . La evaluación de palatabilidad aplicada demostró aceptabilidad excepcional para la formulación ODT. Conclusión: Las microesferas de Memantina preparadas por una técnica de dispersión sólida resultaron en una ODT con adecuado desempeño biofarmacéutico.

V. Abstract

New approaches are required to improve compliance in older patients with problems in swallowing traditional formulations. A novel memantine orodispersible tablet (ODT) was formulated, and its bioavailability and taste acceptability were evaluated. Materials & methods: In vitro characterization of ODT comprised dispersion in simulated saliva prior to dissolution assay in a limited volume of biorelevant media. A single oral dose of 20-mg memantine ODT exhibits similar bioavailability to that of an immediate release 20-mg tablet in a healthy population under fasting conditions. Results: 90% confidence interval for C_{\max} was of 96.78–106.52% and 98.27–104.78% for AUC_{0-72} . An applied palatability survey showed exceptional acceptance of the formulation. Conclusion: Memantine microspheres prepared by a solid-dispersion technique results in ODT with adequate biopharmaceutical performance.

VI. Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el envejecimiento de una población “debe ser considerado un éxito de las políticas de salud pública y desarrollo socioeconómico, pero también implica un reto para su sociedad, la cual debe adaptarse para maximizar la salud y el estado funcional de los ciudadanos adultos mayores”. El Consejo Nacional de Población prevé que para el año 2050, las mujeres adultas mayores de 60 años representarán el 23.3% de la población femenina total y los hombres de edad similar representarán el 19.5% de la población masculina total. El envejecimiento esta acompañado de múltiples comorbilidades, incluyendo enfermedades mentales como la depresión (en un 17.6%), déficit cognitivo (en un 7.3%) y diversos tipos de demencia (en un 7.9%)(Instituto Nacional de las Mujeres, 2015).

Durante la terapéutica de la población geriátrica severos problemas se vuelven evidentes, tales como el correcto entendimiento de las instrucciones, dificultad en la apertura de sistema contenedor, partir / dividir las tabletas manualmente y tragar / deglutir formulaciones sólidas orales. En este contexto, la “*European Medicines Agency*” (Agencia Europea de medicamentos, EMA) ha trabajado en un manuscrito llamado “*Quality aspects in the pharmaceutical development of medicines for older people*” (Aspectos de calidad del desarrollo farmacéutico de medicamentos para gente adulta mayor). Este manuscrito reporta tres aspectos clave sobre el uso práctico de los medicamentos por la población geriátrica incluyendo los siguientes: condiciones de almacenamiento, sistema contenedor con facilidad de apertura y formulaciones farmacéuticas novedosas, tales como minitables y tabletas orodispersables (ODTs) (van Riet-Nales *et al.*, 2016).

Siguiendo estas premisas, declarando a la demencia como la primera causa de incapacidad en población adulta mayor, la OMS ha considerado el tratamiento de la demencia como una prioridad de salud pública para la asistencia social. Se han publicado esfuerzos recientes para formular memantina en un sistema novedoso de liberación transdérmica (del Río-Sancho *et al.*, 2017). Memantina (3,5-dimetiladamantan-1-amina; CAS no. 19982-08-02) es un antagonista no competitivo

del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) efectivo en el tratamiento de la demencia moderada a severa, incluyendo síntomas de la enfermedad de Alzheimer, con varias ventajas sobre otros medicamentos antidemencia (Fukui *et al.*, 2017) y ha sido recientemente implicado en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (Marinova, Chuang and Fineberg, 2017).

El desarrollo de las ODTs de clorhidrato de memantina es una estrategia terapéutica reciente (Jeevitha and Pandey, 2016). Las ODTs se han vuelto una tecnología para facilitar la administración y la deglución, con aceptabilidad en el sabor para la población geriátrica, lo cual resulta en un mayor apego a tratamiento (Deshpande and Ganesh, 2011). Clorhidrato de memantina es una molécula de alta solubilidad (35 mg/ml en agua a 20°C) y de alta permeabilidad (correspondiendo a clase biofarmacéutica I; $\log P = 3.28$; $pK_a = 10$). Es reconocido por varias entidades regulatorias que la prueba de bioequivalencia puede ser bioexenta por ensayos de disolución adecuados. Sin embargo, la agencia regulatoria mexicana, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), establece que para formulaciones novedosas que no han sido previamente comercializadas en México, es esencial demostrar bioequivalencia con la formulación de referencia disponible en el mercado mexicano, esto bajo el concepto de alternativa farmacéutica establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM) NOM-177-SSA1-2013 (Secretaría de Salud, 2013).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue describir las estrategias en el desarrollo de ensayos *in vitro* para evaluar el desempeño en disolución de una nueva formulación de ODT de memantina, así como su desempeño biofarmacéutico durante un ensayo clínico de biodisponibilidad comparada en voluntarios sanos mexicanos, además de la aceptabilidad de la ODT mediante una evaluación organoléptica.

VII. Materiales y métodos

1. Químicos y reactivos

Los estándares de memantina (Olainfarm; Riga, Latvia) fueron suministrados por Productos Científicos S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). Acetonitrilo grado HPLC, en adición a ácido clorhídrico, cloruro de sodio, ácido fosfórico, fosfatos monobásico y dibásico de potasio y amilamina de grado analítico así como Triton™ X-100 y Tween™ 80, fueron comprados de JT Baker (Ciudad de México, México), mientras que el ácido fórmico fue obtenido de Sigma-Aldrich-Fluka (Toluca, México). Agua grado ultrapura fue obtenida directamente de un sistema Milli-Q™ (Millipore, Massachusetts, EEUU).

Akatinol® tabletas de liberación inmediata de 20 mg (Merz Pharma; Ciudad de México, México) fueron utilizadas como producto / medicamento de referencia, mientras que ODTs de memantina de 20 mg (Productos Científicos S.A. de C.V., Carnot® Laboratorios; Ciudad de México, México) fueron utilizadas como producto / medicamento de prueba.

2. Formulación de las tabletas orodispersables

Las ODTs de memantina fueron formuladas utilizando excipientes comunes para esta tecnología (por ejemplo, crospovidona y almidón como desintegrantes, celulosa microcristalina y manitol como diluyentes, talco en polvo como lubricante, sucralosa y sabores fresa y menta artificiales). Las microesferas de memantina fueron preparadas por una técnica de dispersión sólida con alcohol estearílico utilizando Eudragit™ EPO (Evonik Health Care; Indianapolis, EEUU) como tecnología de enmascaramiento de sabor. Las ODTs de memantina fueron tableteadas con forma redonda, plana, biranurada, con una dureza promedio de 30.4 N, peso promedio de 400 mg por tableta, diametro de 9 mm y grosor de 3 mm.

3. Pruebas de disolución

a. Condiciones farmacopéicas

Las primeras pruebas de la ODT y Akatinol® fueron realizadas de acuerdo a las condiciones farmacopéicas estadounidenses (USP) para formas farmacéuticas

solidas de memantina (The United States Pharmacopeia, 2016). En resumen, el método consiste en ensayar seis unidades de cada formulación en 900 ml de medio de disolución (HCl 0.1 N y 2 g/l de NaCl), utilizando aparato I a 100 r.p.m., 37°C, con muestreo de 10 ml sin reposición a los 10, 20, 30 y 45 minutos. Los equipos de disolución utilizados fueron Distek 2500 (New Jersey, EEUU).

b. Medio discriminativo

Con el propósito de establecer un ensayo más discriminativo, las siguientes condiciones fueron propuestas para simular el ambiente fisiológico intestinal en términos de volúmenes bajos, pH, osmolaridad y tensión superficial. Metodología previamente reportada (Vertzoni *et al.*, 2005; Zolnik and Burgess, 2008) fue adaptada como sigue: Aparato de disolución II a 25 r.p.m., 250 ml de medio de disolución, muestreo de 3 ml sin reposición a los 1, 3, 5, 10, 20 y 30 minutos. El medio de disolución estaba compuesto por HCl 0.1 N, Triton™ X-100 (0.1%), NaCl 2 g/l, pH 1.2, o HCl 0.1 N, Tween™ 80 (0.1%), NaCl 2 g/l, pH 1.2.

c. Saliva simulada

Por último, para simular las condiciones bucales de dispersión y disolución, se incluyó un paso de dispersión previo en saliva simulada para la ODT justo antes de realizar el ensayo de disolución. Las ODTs fueron colocadas en 1 ml de saliva simulada (NaCl 8 g, fosfato monobásico de potasio 0.19 g y fosfato dibásico de potasio 2.38 g, todo en 1 l de agua ultrapura, con pH ajustado a 6.8) durante 1 minuto; después, tanto las ODTs dispersadas como el Akatinol® fueron evaluados en el medio discriminativo para continuar con las pruebas de disolución (Marques, Loebenberg and Almukainzi, 2011).

d. Cuatificación de memantina en muestras de disolución

HPLC (Waters 2695; Massachusetts, EEUU) acoplado a detector de índice refractivo (Waters 2414RI) fueron utilizados interconectados por el software Empower® (Massachusetts, EEUU). La separación de memantina fue realizada mediante una columna Hypersil Gold C18 (4.6 x 150 mm, tamaño de partícula 5 µm; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU). La tasa de flujo se mantuvo a 1 ml/min bajo condiciones isocráticas, con una fase móvil de amortiguador acuoso (1 ml de ácido fosfórico más 1 ml de amilamina en 1 l de agua ultrapura) / acetonitrilo

(80:20 v/v). La columna se mantuvo a 40 °C y la temperatura del automuestreador se mantuvo a 10 °C. El volúmen de inyección fue de 5 µl, completando una corrida en 3 min. La memantina fue cuantificada utilizando curvas de calibración validadas para cada medio de disolución en un rango de disolución de 40-120% (Gupta *et al.*, 2014).

4. Ensayo clínico de biodisponibilidad comparada

18 voluntarios sanos mexicanos participaron en este estudio: 7 mujeres y 11 hombres. Los criterios de inclusión fueron IMC entre 18 y 27 kg/m², edad entre 18 y 55 años, electrocardiograma e historia clínica normales, valores de laboratorio en rangos normales (biometría hemática, química sanguínea, exámen general de orina y pruebas de función hepática), no fumadores y negativos para serología de VIH, hepatitis B y C, y en mujeres, negativas para prueba de embarazo. Los criterios de exclusión comprendieron historial de alergia a alguno de los componentes de las formulaciones ensayadas, embarazo, alcoholismo activo, resultados positivos para prueba rápida de cocaína, barbitúricos, benzodiazepinas, metanfetaminas y tetrahidrocanabinol en orina, y cualquier condición de salud seria que pudiera afectar la evolución del estudio. Las situaciones de retiro del estudio consideraron cualquier tipo de reacción de hipersensibilidad, pérdida de dos o más muestras alrededor de C_{máx}, vómito entre la administración y dos veces la T_{máx} o cualquier transgresión de la dieta (Secretaría de Salud, 2013).

Todos los voluntarios brindaron su consentimiento a través del formato de consentimiento informado firmado, y fueron estrictamente monitoreados durante todo el estudio. El protocolo para el estudio clínico fue revisado y aprobado por el Comité de Ética perteneciente al “*Global Bioanalytical Consulting*”, y autorizado por la COFEPRIS con el registro de estudio no. 163300410B0263/2016. El estudio fue conducido con entero cumplimiento de la última declaración de Helsinki y de acuerdo con las Buenas Prácticas Clínicas definidas por el Consejo Internacional de Armonización (ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL, 2014; ICH, 2016).

El estudio clínico fue controlado, aleatorizado, simple ciego al investigador analítico, cruzado, de dos períodos (muestreo truncado a las 72 h por período, con 18 días de

lavado entre período), dos tratamientos (ODT de memantina de 20 mg o Akatinol® tableta de liberación inmediata de 20 mg), en condiciones de ayuno. Los grupos experimentales tuvieron el mismo número de voluntarios aleatoriamente asignados a cada secuencia de tratamiento.

El proceso general en cada período fue el siguiente: Los voluntarios se presentaron el día previo a la administración. Recibieron la cena a las 8:00 p.m. y cumplieron ayuno prolongado de 12 h durante la noche. A la siguiente mañana, un catéter intravenoso fue colocado en el área del antebrazo. A las 8:00 a.m. para el caso de los voluntarios que recibieron Akatinol®, una única dosis fue deglutida con 250 ml de agua pura; en el caso de los voluntarios que recibieron la ODT de memantina, ellos enjuagaron sus bocas rápidamente con 20 ml de agua pura, la deglutieron y colocaron la ODT sobre su lengua, realizando movimientos suaves para dispersar la tableta con la boca cerrada sin deglutir, una vez la ODT se dispersó, las partículas fueron deglutidas por completo y 230 ml de agua pura fueron deglutidos con el objetivo de comparar ambas formulaciones bajo las mismas condiciones de cantidad de líquidos.

Aproximadamente 6 ml de sangre fueron extraídos de cada voluntario participante para cada tiempo de muestreo a través del catéter a las 0 h (antes de la administración) y a las 1, 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9, 12, 24, 48 y 72 h después de la administración de memantina. Las muestras fueron extraídas en tubos heparinizados y centrifugadas a 4000 r.p.m. por 5 min a 20 °C para la separación del plasma. El plasma fue separado en crioviales identificados y almacenado a -70 °C hasta la cuantificación de memantina.

5. Determinación de memantina en plasma humano

La extracción de la muestra, la cromatografía y la configuración del espectrómetro fueron ajustes de trabajos previamente reportados (Konda *et al.*, 2012; Lou *et al.*, 2012). Brevemente, 100 µl de plasma fueron fortificados con 20 µl de solución de amantadina (estándar interno: 200 ng/ml en metanol 60%), alcalinizados con 20 µl de una solución al 10% de hidróxido de amonio, las proteínas se precipitaron con

300 µl de acetonitrilo (4 °C) y se centrifugaron; el sobrenadante fue mezclado con agua en una razón de 1:1 y 2 µl fueron inyectados al UPLC.

UPLC (Acquity™ Clase I, Waters, Massachusetts, EEUU) acompañado a un espectrómetro de masas en tándem (Xevo™ TQ-S, Waters Micromass, Manchester, Reino Unido) fue empleado interconectado al software Masslynx™ versión 4.1. La memantina y la amantadina fueron separados de posibles interferencias endógenas empleando una columna BEH C18 (2.1 x 50 mm, tamaño de partícula 1.7 µm (Acquity™ UPLC, Waters; Dublin, Irlanda). La tasa de flujo se fijó a 0.45 ml/min bajo condiciones isocráticas, y la fase móvil fue optimizada con 0.1% ácido fórmico acuoso / 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (85:15 v/v). La columna se mantuvo a 40 °C y la temperatura del automuestreador se mantuvo a 10 °C. Bajo estas condiciones la corrida se completó en 5 min.

La cuantificación se realizó mediante electroespray positivo, seleccionando las transiciones de iones de m/z^{+1} 180.20 > 163.15 y 152.20 > 135.15 para memantina y amantadina respectivamente.

El método fue adecuadamente validado de acuerdo a la guía mexicana (Secretaría de Salud, 2013) y provó ser lineal, preciso y exacto entre 0.8 y 80 ng/ml de memantina.

6. Evaluación organoléptica

Una evaluación de palatabilidad y aceptabilidad basada en el trabajo previo de Nilausen *et al* fue aplicada a los 18 voluntarios que participaron en el estudio de biodisponibilidad comparada durante el periodo de prueba del producto / medicamento de prueba (Nilausen, Zuiker and van Gerven, 2011). La evaluación comprendió 35 preguntas agrupadas en 5 ítems, con la intención de evaluar lo siguiente: propiedades físicas de la ODT (tamaño de la tableta, textura, velocidad de desintegración y cantidad de residuos); percepción de sabor (sabor inicial y residual); confort en el uso (comparado contra otras formas farmacéuticas sólidas); facilidad de uso (facilidad de apertura del sistema contenedor y facilidad de

manipulación); y apego a tratamiento (comparado contra otras formas farmacéuticas).

Las respuestas de la evaluación fueron obtenidas a través de una escala análoga visual de 10 cm validada, en la que las posibles respuestas podrían caer entre valores opuestos (completamente desacuerdo a completamente de acuerdo) que fueron transformados a escala numérica en rango de 0 a 10. Promedio aritmético y % CV fueron calculados para cada pregunta con el objetivo de establecer el valor del ítem y los valores de % CV fueron utilizados para describir concordancia entre preguntas e ítems. Valores de <35 % CV fueron asignados como alta concordancia, valores entre 35 y 75 % CV fueron asignados como moderada concordancia y valores > 70 % CV fueron asignados como pobre concordancia.

7. Análisis estadístico

Para los perfiles de disolución, el abordaje de serie de tiempos independientes fue empleado para comparar ensayos cuando las diferencias no fueron evidentes.

Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados del plasma analizado obtenido de los voluntarios utilizando el software WinNonlin 6.4 (Certara LP, New Jersey, EEUU) considerando un modelo no compartimental. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$), ABC hasta las 72 h (ABC_{0-72}) y la constante de eliminación (k_e) fueron cálculos del software. $C_{m\acute{a}x}$ y $T_{m\acute{a}x}$ se obtuvieron experimentalmente.

Para evaluar los efectos fijos como el período, secuencia y formulación, utilizamos análisis de varianza (ANOVA) para diseño cruzado 2 x 2 estándar. Las diferencias farmacocinéticas fueron evaluadas basadas en abordaje de bioequivalencia, construyendo intervalos de confianza al 90% para las relaciones log-transformadas de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-72} entre ambas formulaciones. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Phoenix WinNonlin and Minitab TM versión 16 (Minitab, State College, Pensilvania, EEUU).

Respecto a la evaluación organoléptica, la medición de consistencia entre ítems fue validada con el uso de alfa de Cronbach (Oviedo Celina and Campo-Arias, 2005).

Las posibles diferencias entre secuencias de administración fueron analizadas mediante prueba de T para muestras independientes.

VIII. Resultados y discusión

1. Pruebas de disolución

Los diferentes resultados obtenidos en las pruebas de disolución se muestran en la **Figura 1**. Como se puede observar, el medio farmacopéico no fue capaz de discriminar diferencias de solubilidad entre formulaciones (**Figura 1A**), confirmando que dichas condiciones son adecuadas para evaluación de control de calidad pero no se parecen a las condiciones fisiológicas.

Estos resultados obligaron el trabajo en equipo multidisciplinario para desarrollar medios más discriminativos. El nuevo medio propuesto, apuesta por simular las condiciones que reflejen la disolución en el microambiente en el cual las tabletas se disolverán, tales como volúmenes pequeños, pH ácido, osmolaridad y tensión superficial de líquidos intestinales, en los cuales las formulaciones se desintegrarán y liberarán la memantina. Los primeros resultados con el medio que contiene Triton™ X-100 no correspondieron al comportamiento esperado para ambas formulaciones por que el producto / medicamento de referencia exhibe una liberación más rápida comparado con la ODT (**Figura 1B**).

Así pues, se decidió cambiar el Triton™ X-100 (tensión superficial de 42.5 mN/m) por Tween™ 80 (tensión superficial de 41 mN/m), este último más parecido a la tensión superficial producida por los surfactantes endógenos. Además de esto, el granulado no comprimido de la ODT fue ensayado con el objetivo de determinar si la falta de liberación de memantina estaba relacionada con algunos excipientes, o causada por el proceso de compresión (**Figura 1C**). Se observó que la liberación lenta de memantina esta relacionada con la desintegración de la ODT como paso limitante, lo cual no se observó con el granulado.

Con el objetivo de imitar las condiciones normales de la administración de la ODT, propusimos que la ODT se desintegrara previamente en 1 ml de saliva simulada por 1 minuto, y después se agregara el material disperso en el medio de disolución con Tween™ 80. Es evidente (**Figura 1D**) que los perfiles de disolución concuerdan con las formulaciones farmacéuticas. Mientras que la ODT posee rápida y completa

disolución en los primeros tiempos, el producto / medicamento de referencia demuestra un período de humectación y desintegración con disolución gradual que alrededor de los 30 min es bastante similar a los niveles de la ODT, debido a que la memantina es considerada una molécula de alta solubilidad, al tiempo promedio de vaciamiento gástrico y al mecanismo de absorción de la molécula, no se esperaba que dichas diferencias fuesen relevantes durante el ensayo clínico.

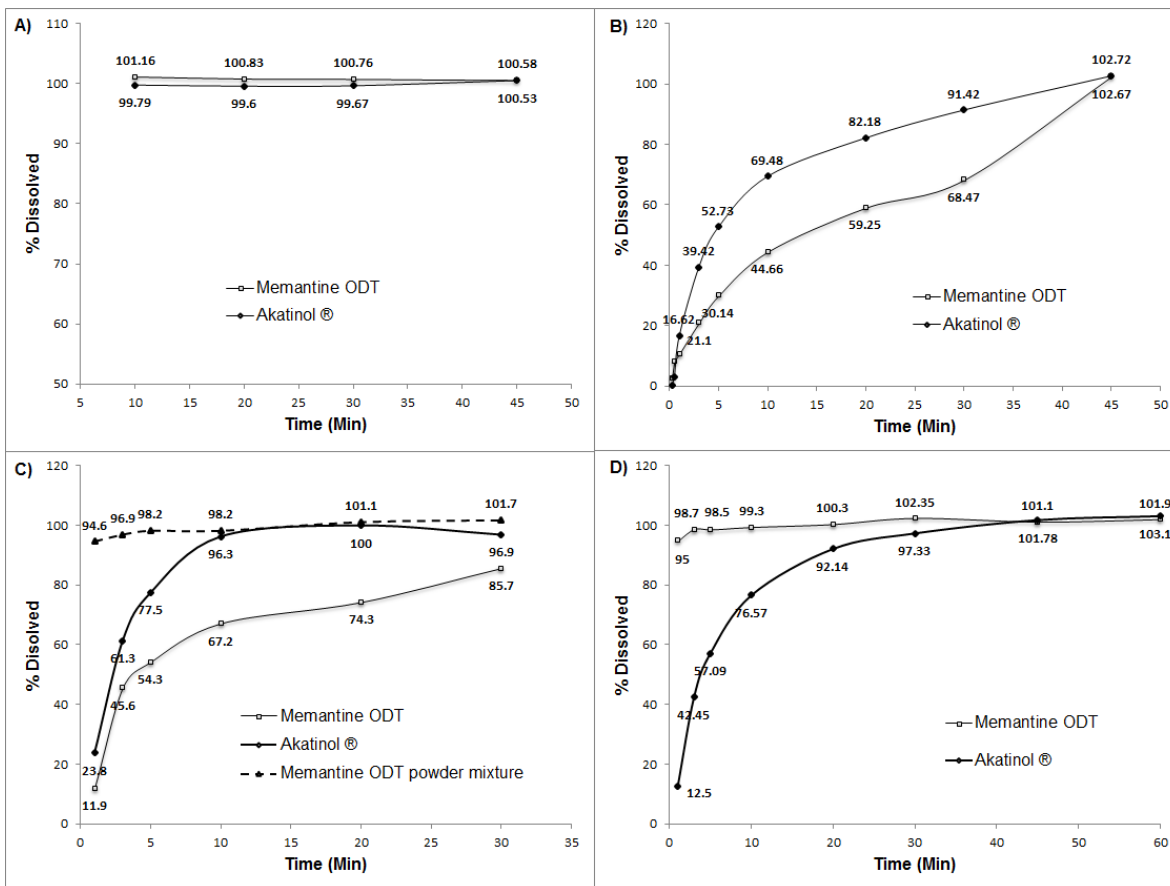


Figura 1. Perfiles de disolución de la ODT de memantina 20 mg y de Akatinol® tabletas de liberación inmediata de 20 mg. (A) En medio USP son prácticamente iguales a pesar de los diferentes mecanismos de liberación de la forma farmacéutica. **(B)** El primer medio simulando condiciones fisiológicas. **(C)** Medio simulando condiciones fisiológicas, se añade la evaluación del granulado para identificar paso limitante de la liberación de memantina en la ODT. **(D)** La ODT pasa por saliva simulada previo a entrar a condiciones (C).

2. Ensayo clínico de biodisponibilidad comparada

Los perfiles de concentración plasmática-tiempo de los 18 voluntarios para memantina hasta las 72 h son presentados en la **Figura 2**. Todos los parámetros farmacocinéticos calculados se resumen en la **Tabla 1**. Como se puede apreciar, no se observaron diferencias significativas en términos de velocidad de absorción y de cantidad total absorbida (**Tabla 2**) respectivamente. Por lo tanto, parece que la desintegración oral y la rápida disolución de la ODT en el intestino, no ejercen efecto en la biodisponibilidad de la memantina.

En lo que respecta a los datos farmacocinéticos obtenidos en población mexicana, es interesante notar diferencias con información previamente publicada de otras poblaciones. En una muestra de la población india sana, los voluntarios participantes recibieron una única dosis oral de 10 mg en condiciones de ayuno, alcanzando $C_{m\acute{a}x}$ de 14.39 ng/ml, (aproximadamente 44% menos que la mitad de la dosis utilizada en este estudio), mientras que la $T_{m\acute{a}x}$ fue 7.5 h con una $t_{1/2}$ de 49 h (Lou *et al.*, 2012). Además, en un estudio brasileño conducido bajo las mismas condiciones, con una dosis única de 10 mg vía oral, la $C_{m\acute{a}x}$ fue de 21.6 ng/ml (86.4% de la $C_{m\acute{a}x}$ adquirida en mexicanos, pero usando la mitad de la dosis), con una $T_{m\acute{a}x}$ retrasada de 8 h y una $t_{1/2}$ de 43 h (César *et al.*, 2012). Por último mencionar que los datos obtenidos de este estudio son mucho más similares a los de una población china, donde los autores reportaron una $C_{m\acute{a}x}$ de 25.34 ng/ml con una $T_{m\acute{a}x}$ de 6.8 h y una $t_{1/2}$ de 62 h con una dosis única de 20 mg (Liu *et al.*, 2008).

Aunque se sabe que la memantina es pobremente metabolizada, todas estas diferencias farmacocinéticas aparentes entre poblaciones y su relevancia clínica podrían ser exploradas a detalle, sobre todo ahora que se ha descrito el papel de la memantina sobre los mecanismos celulares asociados con la prevención de la expresión de moléculas de adhesión celular inducidas por señales proinflamatorias en el endotelio de la microvasculatura cerebral humana, lo cual está ligado con déficit cognitivo y demencia durante el envejecimiento (Wang *et al.*, 2017).

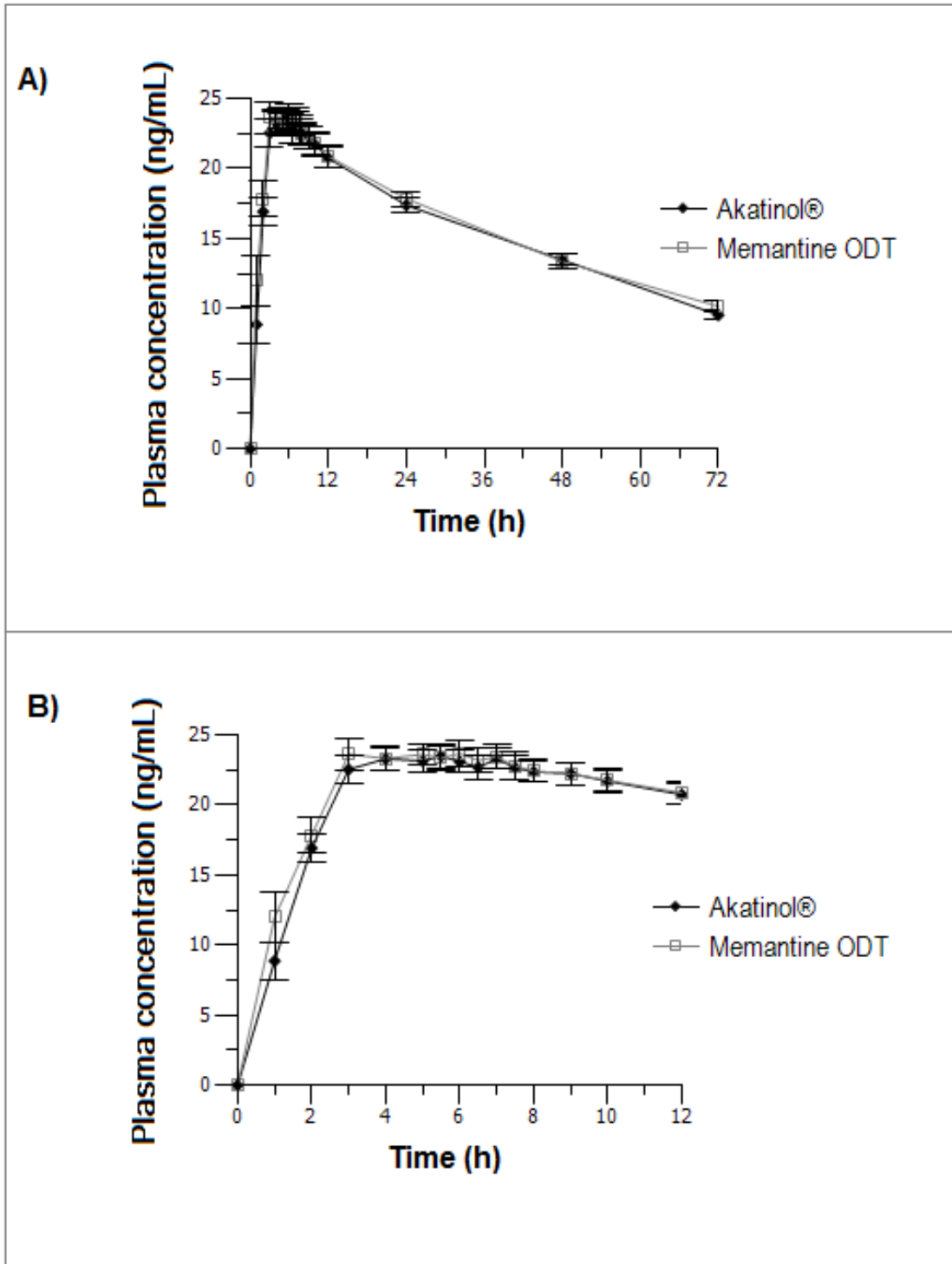


Figura 2. Perfil de concentración plasmática-tiempo de memantina en 18 voluntarios sanos mexicanos. (A) Muestra completa truncada a las 72 h. (B) Perfil farmacocinético de las primeras 12 h.

	Promedio	Desv Est	% CV	Mínimo	Máximo
Memantina ODT					
T_{máx} (h)	4.97	2.018	40.587	1	7.5
C_{máx} (ng/ml)	25.491	4.655	12.261	17.226	34.638
K_e (h⁻¹)	0.013	0.003	21.995	0.009	0.018
t_{1/2} (h)	58.578	12.824	21.893	38.885	80.818
ABC₀₋₇₂ (ng.h/ml)	1134.092	168.428	14.851	825.306	1446.796
Akatinol®					
T_{máx} (h)	5	1.871	27.417	2	7.5
C_{máx} (ng/ml)	24.931	3.346	13.421	17.384	29.808
K_e (h⁻¹)	0.013	0.003	19.503	0.009	0.019
t_{1/2} (h)	55.871	10.064	18.014	36.118	77.509
ABC₀₋₇₂ (ng.h/ml)	1113.515	135.005	12.124	915.021	1378.009

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de memantina después de la administración de una dosis única oral de 20 mg en voluntarios sanos mexicanos bajo condiciones de ayuno.

Parámetro	% CV intrasujeto	Intervalos de confianza al 90%		Poder estadístico
		Inferior	Superior	
C_{máx} (ng/ml)	8.25	95.992	108.284	1
ABC₀₋₇₂ (ng.h/ml)	5.51	100.232	111.015	1

Tabla 2. Estadística de bioequivalencia entre la ODT de memantina como producto / medicamento de prueba y Akatinol® como producto / medicamento de referencia.

3. Evaluación organoléptica

La evaluación fue completamente validada previamente utilizando ODTs placebo con diferentes características en personal voluntario y no se observó efecto de la secuencia de administración.

Las respuestas más concordantes en términos de valores promedio en la escala análoga visual fueron (en orden decreciente):

Las ODTs tienen un sabor agradable.

Las ODTs no dejan un sabor desagradable ni sensación en la boca.

Las ODTs podrían ser preferidas sobre tabletas convencionales u otro tipo de formas farmacéuticas con mejor apego a tratamiento a largo plazo.

Las ODTs son fáciles de manejar y no se rompen en el empaque ni en los dedos.

IX. Conclusión

Se puede concluir que las condiciones de disolución farmacopéicas tienen objetivo de control de calidad, y que en muchos casos, estas no tienen la capacidad discriminativa para diferenciar en la liberación de ingredientes farmacéuticos de las formas farmacéuticas, que podrían repercutir en la biodisponibilidad de los fármacos. Los avances de la tecnología farmacéutica (novedades farmacéuticas, nanotecnología farmacéutica, etc.), el desarrollo, validación e implementación de ensayos de disolución discriminativos deben simular las condiciones fisiológicas, tales como volúmenes pequeños, velocidades de agitación bajas, tensión superficial similar, pH y temperatura así como considerar particularidades dependiendo de la forma farmacéutica, en el caso de las ODTs, una desintegración previa.

Respecto de la ODT desarrollada, exhibió características adecuadas de palatabilidad y fue bien aceptada en una muestra de voluntarios sanos. Las ODTs de memantina fueron bioequivalentes al producto / medicamento de referencia y la farmacocinética en la población mexicana demostró algunas diferencias con lo reportado previamente en otras poblaciones.

Con este desarrollo biofarmacéutico y su caracterización farmacocinética y de palatabilidad en humanos, la ODT de memantina ha establecido un nuevo abordaje terapéutico con propuesta de valor acorde a la guía de EMA.

Considerando el envejecimiento de la población global, es seguro que comencemos a observar más desarrollos y comercialización de formas farmacéuticas novedosas como las ODTs, minitabletas, parches transdérmicos, nanopartículas y demás, enfocados al tratamiento de la población geriátrica. Durante el desarrollo de dichas novedades de formulaciones, los investigadores deben enfocarse en desarrollar nuevas evaluaciones *in vitro* que simulen a las características fisiológicas humanas, no solo en términos de liberación y disolución sino nuevos dispositivos y métodos que permitan la evaluación de desintegración, vaciamiento gástrico y tránsito intestinal, reabsorción entérica, etc. La generación de estas nuevas metodologías permitirán establecer correlaciones *in vitro* – *in vivo* de tal manera que podamos reducir los tiempos de desarrollo y la experimentación humana.

X. Información financiera del proyecto

Este estudio recibió financiamiento de Productos Científicos, S.A. de C.V.

XI. Consideraciones éticas de la investigación

El protocolo clínico fue evaluado y aprobado por el comité de ética en investigación y comité de investigación independientes. Posteriormente el protocolo clínico fue autorizado por la COFEPRIS. Todos los voluntarios otorgaron su consentimiento mediante la firma de formato de consentimiento informado formulado de acuerdo a la última versión de la Declaración de Helsinki (ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL, 2014).

XII. Referencias

1. ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL (2014) 'DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA AMM – PRINCIPIOS ÉTICOS PARA LAS INVESTIGACIONES MÉDICAS EN SERES HUMANOS'.
2. César, I. C. *et al.* (2012) 'Bioequivalence study of two oral formulations of memantine tablets in healthy Brazilian volunteers after a single dose administration', *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, 4(2), pp. 014–017. doi: 10.4172/jbb.1000104.
3. Deshpande, K. B. and Ganesh, N. S. (2011) 'Orodispersible tablets: An overview of formulation and technology', *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), pp. 726–734.
4. Fukui, Y. *et al.* (2017) 'Different clinical effect of four antimentia drugs for Alzheimer's disease patients depending on white matter severity', *Geriatrics and Gerontology International*, 17(11), pp. 1991–1999. doi: 10.1111/ggi.13007.
5. Gupta, A. K. *et al.* (2014) 'ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF STABILITY- INDICATING HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF ASSAY OF MEMANTINE HYDROCHLORIDE TABLETS', *International Journal of Pharmacy Practice & Drug Research*, 4(1), pp. 12–14.
6. ICH (2016) *INTEGRATED ADDENDUM TO ICH E6(R1): GUIDELINE FOR GOOD CLINICAL PRACTICE E6(R2)*.
7. Instituto Nacional de las Mujeres (2015) 'Situación de las personas adultas mayores en México', *Dirección de Estadística*, 1(1), p. 40.
8. Jeevitha, M. and Pandey, V. (2016) 'Formulation and development of orodispersible tablet of memantine hydrochloride', *International Journal of Drug Development and Research*, 8(1), pp. 30–35.
9. Konda, R. K. *et al.* (2012) 'Bioanalytical method development and validation of memantine in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence study', *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1(1). doi: 10.1155/2012/101249.
10. Liu, M. Y. *et al.* (2008) 'Pharmacokinetics of single-dose and multiple-dose

- memantine in healthy chinese volunteers using an analytic method of liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Clinical Therapeutics*, 30(4), pp. 641–653. doi: 10.1016/j.clinthera.2008.04.005.
11. Lou, H. *et al.* (2012) 'QUANTITATIVE DETERMINATION OF MEMANTINE IN HUMAN PLASMA BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY: APPLICATION TO A BIOEQUIVALENCE STUDY', *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(19), pp. 2696–2705. doi: 10.1080/10826076.2011.637276.
 12. Marinova, Z., Chuang, D.-M. and Fineberg, N. (2017) 'Glutamate-Modulating Drugs as a Potential Therapeutic Strategy in Obsessive-Compulsive Disorder', *Current Neuropharmacology*, 15(7). doi: 10.2174/1570159X15666170320104237.
 13. Marques, M. R. C., Loebenberg, R. and Almukainzi, M. (2011) 'Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing', *Dissolution Technologies*, 18(3), pp. 15–28. doi: 10.1002/jps.23029.
 14. Nilausen, D. Ø., Zuiker, R. G. J. a and van Gerven, J. (2011) 'The Perception and Pharmacokinetics of a 20-mg Dose of Escitalopram Orodispersible Tablets in a Relative Bioavailability Study in Healthy Men', *Clinical Therapeutics*. Elsevier Inc., 33(10), pp. 1492–1502. doi: 10.1016/j.clinthera.2011.09.012.
 15. Oviedo Celina, H. and Campo-Arias, a (2005) 'Aproximación al uso Coeficiente Alfa de Cronbach', *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 34(4), pp. 572–80. doi: 10.1590/S1135-57272002000200001.
 16. van Riet-Nales, D. A. *et al.* (2016) 'Regulatory incentives to ensure better medicines for older people: From ICH E7 to the EMA reflection paper on quality aspects', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 512(2), pp. 343–351. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.001.
 17. del Río-Sancho, S. *et al.* (2017) 'Transdermal therapeutic systems for memantine delivery. Comparison of passive and iontophoretic transport', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 517(1–2), pp. 104–111. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.038.

18. Secretaría de Salud (2013) *NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.*
19. The United States Pharmacopeia (2016) *Memantine hydrochloride tablets, In: The United States Pharmacopeia. USP 39 & NF 34, Rockville, MD, USA.*
20. Vertzoni, M. *et al.* (2005) 'Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(3), pp. 413–417. doi: 10.1016/j.ejpb.2005.03.002.
21. Wang, F. *et al.* (2017) 'Regulation of Human Brain Microvascular Endothelial Cell Adhesion and Barrier Functions by Memantine', *Journal of Molecular Neuroscience*. *Journal of Molecular Neuroscience*, 62(1), pp. 123–129. doi: 10.1007/s12031-017-0917-x.
22. Zolnik, B. S. and Burgess, D. J. (2008) 'In Vitro–In Vivo Correlation on Parenteral Dosage Forms', in Rajesh K and Lawrence Y (eds) *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. Springer, pp. 336–358.

XIII. Anexos

Se anexa el manuscrito original en inglés. Para consultarlo en internet siga la liga de la sección III de este documento.

Development of memantine orodispersible tablets and their *in vitro* description and biopharmaceutical performance

Carlos Adrián Peñaloza-Becerra¹, Gabriel Marcelín-Jimenez^{*,2}, Mariel Vanessa López-González¹, Ernesto Ortega-Escamilla¹, Juan Ernesto Vásquez-Vásquez¹, Alionka P Ángeles-Moreno², Alberto García-González², Dany Batista-Dieguez³ & Estefanía Rodarte-Valle³

¹Centro AF de Estudios Tecnológicos, SA de CV, Nicolás San Juan 2014, Del Valle, Col del Valle Centro, Del Benito Juárez, 03100 Ciudad de Mexico (CDMX), Mexico

²Global Bioanalytical Consulting, SC, Av Insurgentes Sur No 1188, Dpto 203; Col Tlacoquemecatl, 03200 Del Benito Juárez, 03200 CDMX, Mexico

³Pharmometrica (Pharmet, SA de CV), Av de las Granjas 972 LC-08A, Col Santa Bárbara, Tecnoparque Azcapotzalco, 02230 CDMX, Mexico

* Author for correspondence: Tel.: +52 559 127 0111; gabmarcelin@gbioanalytical.com.mx

Aim: New approaches are required to improve compliance in older patients with problems in swallowing traditional formulations. A novel memantine orodispersible tablet (ODT) was formulated, and its bioavailability and taste acceptability were evaluated. **Materials & methods:** *In vitro* characterization of ODT comprised dispersion in simulated saliva prior to dissolution assay in a limited volume of biorelevant media. A single oral dose of 20-mg memantine ODT exhibits similar bioavailability to that of an immediate release 20-mg tablet in a healthy population under fasting conditions. **Results:** 90% confidence interval for C_{max} was of 96.78–106.52% and 98.27–104.78% for AUC_{0-72} . An applied palatability survey showed exceptional acceptance of the formulation. **Conclusion:** Memantine microspheres prepared by a solid-dispersion technique results in ODT with adequate biopharmaceutical performance.

First draft submitted: 5 January 2018; Accepted for publication: 2 February 2018; Published online: 15 February 2018

Keywords: aging • Alzheimer's disease • bioavailability • memantine orodispersible tablets • palatability

According to the WHO, the aging of a population “*should be considered a success of public health policies and socioeconomic development, but it also constitutes a challenge for its society, which must be adapted in order to maximize the health and functional capacities of older citizens*”. It has been predicted by the Mexican Population Council that by the year 2050, women older than 60 years will comprise 23.3% of the total female population and males with similar ages will make up 19.5% of the total male population. Aging is accompanied by multimorbidity, including mental illness such as depression (17.6%), cognitive impairment (7.3%) and several types of dementia (7.9%) [1].

During the therapeutics of the geriatric population, several problems become evident, such as correct understanding of instructions, difficulties in opening containers, breaking tablets manually and swallowing oral solid formulations. In this context, the EMA has worked on a paper entitled ‘Quality aspects in the pharmaceutical development of medicines for older people’. This reflective paper reports on three key aspects concerned with the practical use of medicines for geriatric population including the following: storage conditions, easy-to-open containers and novel pharmaceutical formulations, such as minitables and orodispersible tablets (ODTs) [2].

Under these premises, declaring dementia as the first cause of impairment in older people, the WHO has considered the treatment of dementia as a public health priority for social assistance. Recent efforts to formulate novel transdermal systems for memantine have been published [3]. Memantine (3,5-dimethyladamantan-1-amine; CAS no. 19982-08-2) is a noncompetitive N-methyl-D-aspartate-receptor antagonist effective in the treatment of moderate-to-severe dementia, including the symptoms of Alzheimer's disease, with several advantages over other antidementia drugs [4] and it has recently been implicated in the therapeutics of obsessive compulsive disorders [5].

The development of memantine hydrochloride ODTs is a recent therapeutic strategy [6]. ODT has become a technology for easy administration and swallowing, with taste acceptability for geriatric patients, which results in better treatment compliance [7]. Memantine HCl is a highly soluble (35 mg/ml in water at 20°C) and highly permeable molecule (corresponding to biopharmaceutical class I; $\log P = 3.28$; $pK_a = 10$). It is recognized by several regulatory agencies that bioequivalence can be bio waived by proper dissolution assays. However, the Mexican Regulatory Agency establishes that for novel formulations not previously commercialized in Mexico, it is essential to demonstrate bioequivalence with respect to a reference formulation available on the Mexican market.

Thus, the aims of present work were to describe the strategies in the development of *in vitro* assays to evaluate the dissolution performance of a novel memantine ODT formulation, as well as its biopharmaceutical behavior during a comparative bioavailability trial in Mexican healthy volunteers, and the acceptability of the ODT during an organoleptic survey.

Materials & methods

Chemicals & reagents

Memantine (Olainfarm; Riga, Latvia) and amantadine (Sigma-Aldrich; Toluca, Mexico) standards were kindly supplied by Productos Científicos SA de CV (Mexico City, Mexico). HPLC-grade acetonitrile, in addition to hydrochloric acid, sodium chloride, phosphoric acid, monobasic and dibasic potassium phosphate and amylamide analytical grades, as well as Triton™ X-100 and Tween™ 80, were purchased from JT Baker (Mexico City, Mexico), while formic acid was obtained from Sigma-Aldrich-Fluka (Toluca, Mexico). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q™ system (Millipore, MA, USA).

Akatinol® 20 mg immediate release tablets (Merz Pharma; Mexico City, Mexico) were used as reference product, while memantine 20 mg ODTs (Productos Científicos SA de CV, Carnot Laboratorios; Mexico City, Mexico) were the test products.

Formulation of orodispersible tablets

Memantine ODTs were formulated employing common excipients for this technology (croscopidone and starch sodium glycolate as disintegrants, microcrystalline cellulose and mannitol as diluents, talcum powder as lubricant, sucralose and a strawberry/mint flavor). Memantine microspheres were prepared by a solid-dispersion technique with stearyl alcohol, using Eudragit™ E PO (Evonik Health Care; IN, USA) as taste masker. 20-mg memantine ODTs were round, flat, slotted tablets with a hardness of 30.4 N, an average weight of 400 mg, a diameter of 9 mm and a thickness of 3 mm.

Dissolution tests

Pharmacopeic conditions

Akatinol and first evaluations of ODT were performed by using US Pharmacopeia conditions for solid forms of memantine [8]. Briefly, the method consists of assay having six units of each formulation in 900 ml of dissolution media (HCl 0.1 N and 2 g/l of NaCl), by using apparatus I at 100 r.p.m., 37°C, sampling 10 ml without reposition at 10, 20, 30 and 45 min. Dissolution instruments employed were Distek 2500 (NJ, USA).

Discriminative media

In order to establish a more discriminative assay, the following conditions were proposed that emulate the physiological environment inside the bowel in terms of small volumes, pH, osmolality and surface tension. Methodology previously reported [9,10] was adapted as follows: apparatus II at 25 r.p.m., 250 ml dissolution media, sampling 3 ml without reposition at 1, 3, 5, 10, 20 and 30 min. Dissolution media were as follows: HCl 0.1 N, Triton X-100 (0.1%), NaCl 2 g/l, pH = 1.2, or HCl 0.1 N, Tween 80 (0.1%), NaCl 2 g/ml, pH = 1.2.

Simulated saliva

At last, to resemble the whole bucal dispersion and dissolution process, a dispersion step in simulated saliva was included only for ODT prior to the dissolution assay. ODTs were placed in 1 ml of simulated saliva (NaCl 8 g, monobasic potassium phosphate 0.19 g and dibasic potassium phosphate 2.38 g, all in 1 l of ultrapure water, and adjusted to pH = 6.8) for 1 min; after that, both dispersed ODT and Akatinol were added to discriminative media to continue with dissolution tests [11].

Quantification of memantine in dissolution samples

HPLC (Waters 2695; MA, USA) coupled with a refractive index detector (Waters 2414RI) was employed, interfaced by Empower[®] software (MA, USA). Memantine separation was carried out by means of a Hypersil Gold C18 column (4.6 × 150 mm, 5 µm particle size; Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Flow rate was maintained at 1.0 ml/min under isocratic conditions, with a mobile phase of aqueous buffer (1 ml of phosphoric acid plus 1 ml of amylamine in 1 l of ultrapure water)/acetonitrile (80:20 *v/v*). Column was maintained at 40°C and autosampler temperature was set at 10°C. Volume of sample injection was 5 µl, having a complete run of 3 min. Memantine was quantified by using calibration curves validated for each dissolution medium, in a range of 40–120% dissolution [12].

Comparative bioavailability trial

18 healthy Mexican volunteers participated in this study: 7 women and 13 men. Inclusion criteria were BMI between 18 and 27 kg/m², age between 18 and 55 years, normal electrocardiogram and clinical history, laboratory values within normal ranges (hematology, blood biochemistry, urine analysis and liver function), nonsmokers and negative for AIDS, hepatitis B and C, and in women, for pregnancy tests. Exclusion conditions comprise allergic history to any component of the formulations assayed, pregnancy, active alcoholism, positive results for the rapid urine assay of cocaine, barbiturates, benzodiazepines, methamphetamines and tetrahydrocannabinol, and any serious health condition that would affect the evolution of the study. Withdrawal situations throughout the study considers any kind of hypersensitivity reactions, loss of two or more samples around C_{max} , vomiting between administration time and twofold T_{max} or any diet transgression [13].

All volunteers granted their signed informed consent forms, and were medically monitored closely throughout the entire study. Current protocol was reviewed and authorized by the Global Bioanalytical Consulting Ethics Committee, registered in the Mexican Regulatory Agency (COFEPRIS registration trial no. 163300410B0263/2016) and conducted with full compliance with the latest Declaration of Helsinki and in agreement with the Good Clinical Practice defined by the International Conference on Harmonization.

The clinical study was controlled, randomized, simple-blinded to the analytical investigator, cross-over, two periods (sampling truncated up to 72 h per period, with 18 days of washout period in between), two treatments (20-mg memantine ODT or Akatinol 20 mg immediate release tablet), under fasting conditions. Experimental groups had the same number of volunteers randomly assigned to each treatment sequence.

Volunteers presented the day prior to drug administration. They received dinner at 8:00 pm and fasted overnight (12 h). An intravein catheter was set in a forearm area the next morning. At 8:00 am in the case of volunteers receiving Akatinol, a single dose was taken with 250 ml of water; in the case of volunteers receiving ODT, they washed their mouths briefly with 20 ml of tap water, swallowed this and placed one ODT on the tongue, making gentle motions to disperse the tablets within the closed mouth – no chewing. Then, the particles were completely swallowed and 230 ml of water was drunk in order to compare the bioavailability of both formulations under the same conditions.

Approximately 6 ml of blood was drawn from each study participant for each sample through the catheter at 0 h (before administration) and at 1, 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9, 12, 24, 48 and 72 h after memantine administration. Samples were taken in vacuum heparinized tubes and centrifuged at 4000 r.p.m. for 5 min at 20°C for plasma separation. Plasma was collected in identified cryovials and stored at -70°C until memantine quantitation.

Determination of memantine in human plasma

Sample extraction, chromatography and spectrometer settings were adjustments of previously reported articles [14,15]. Shortly, 100 µl of plasma was fortified with 20 µl of amantadine solution (internal standard: 200 ng/ml in 60% methanol), alkalized with 20 µl of a 10% solution of ammonium hydroxide, proteins were precipitated with 300 µl of acetonitrile (4°C) and centrifuged; supernatant was mixed with water in the ratio 1:1 and 2 µl was introduced into the ultraperformance liquid chromatograph (UPLC).

UPLC (Acquity[™] Class-I/, Waters Co, MA, USA) coupled with a tandem mass spectrometer (Xevo[™] TQ-S, Waters Micromass, Manchester, UK) was employed, interfaced by MassLynx[™] version 4.1 software. Memantine and amantadine were separated from possible endogenous interferences employing a BEH C18 column (2.1 × 50 mm, 1.7 µm particle size, acquity UPLC, Waters; Dublin, Ireland). Flow rate was fixed at 0.45 ml/min under isocratic conditions, and the mobile phase was optimized as 0.1% aqueous formic acid/0.1% formic acid in acetonitrile

(85:15 *v/v*). Column was maintained at 40°C and autosampler temperature was set at 10°C. Under these conditions, a complete run took 5 min.

Quantitation was done by positive electrospray, selecting the ion transitions of m/z^{+1} 180.20 >163.15 and 152.20 >135.15 for memantine and amantadine, respectively.

Method was fully validated according to Mexican guidelines [13] and proved to be linear, precise and accurate between 0.8 and 80 ng/ml of memantine.

Palatability survey

A memantine ODT palatability and acceptability survey (based on Nilausen *et al.*, 2011) was applied to the 18 volunteers who participated in the bioequivalence trial, during the period of test-product intake [16]. The survey comprised 35 questions grouped in five items, with the intention of evaluating the following: physical properties (size of tablet, texture, velocity of disintegration and amount of lumps); perception of taste (initial and residual taste); comfort of use (compared with other solid presentations); ease of use (ease of opening and handling); and treatment compliance (compared with other formulations).

Survey responses were obtained through an analog-visual-validated linear scale of 10 cm, where possible responses could fall between opposite values (completely disagree–fully agree) that were transformed into a numerical scale ranging from 0 to 10. Arithmetic mean and %CV were calculated for each question in order to establish the value of the item, and %CV values were used to describe agreement between questions and items. Values of <35 %CV were assigned as high agreement, 35% < %CV < 70% were assigned as moderate agreement and >70% were assigned as poor agreement.

Statistical analysis

For dissolution profiles, an independent time series approach was employed to compare assays when differences were not evident.

Pharmacokinetic parameters were calculated from analyzed plasma obtained from single dose-receiving volunteers, utilizing Phoenix WinNonlin version 6.4 software (Certara LP, NJ, USA), considering a noncompartmental model. Plasma elimination half-life ($t_{1/2}$), AUC until 72 h (AUC_{0-72}) and elimination constant (k_e) were software outputs. C_{max} and T_{max} were obtained experimentally.

To evaluate fixed effects such as period, sequence and formulation, we utilized analysis of variance (ANOVA) for a standard 2 × 2 crossover design. Pharmacokinetic differences were assayed based on a bioequivalence approach, building 90% CI of log-transformed relationships for C_{max} and AUC_{0-72} between both formulations. Statistical analyses were carried out using Phoenix WinNonlin and Minitab TM version 16 software (Minitab, State College, PA, USA).

Concerning palatability survey, measurement of consistency inside items was validated by the use of Cronbach's alpha [17]. Possible differences between sequences of administration were assayed by the Student's *t*-test for independent samples.

Results & discussion

Dissolution assays

The different results obtained during dissolution assays are depicted in Figure 1. As can be observed, pharmacopeic media were not able to discriminate solubility differences between the formulations (Figure 1A), confirming that such conditions are adequate for quality-control purposes, but that they do not resemble physiological conditions.

These results compelled the development of teamwork in order to assay more discriminative media. The new media adopted, attempted to simulate closer conditions that reflected with dissolution microenvironment in which the tablets would be dissolved, such as small volume of media, acidic pH, osmolality, surface tension of bowel fluids, which were formulations that would disintegrate and deliver the memantine. First results with the medium containing Triton X-100 did not correspond to the expected behavior for both the formulations because the reference product exhibited faster delivery compared with ODT (Figure 1B).

Thus, it was decided to change Triton X-100 (surface tension of 42.5 mN/m) for Tween 80 (surface tension of 41 mN/m), the latter closely simulating the tension produced by endogenous surfactants. In addition to this, noncompressed powders for ODT were assayed in order to determine whether lack of delivery was due to certain excipients, or caused by the compression process (Figure 1C). It was evidenced that slow delivery of memantine was related with a limited disintegration step of the ODT, which was not observed with the powder.

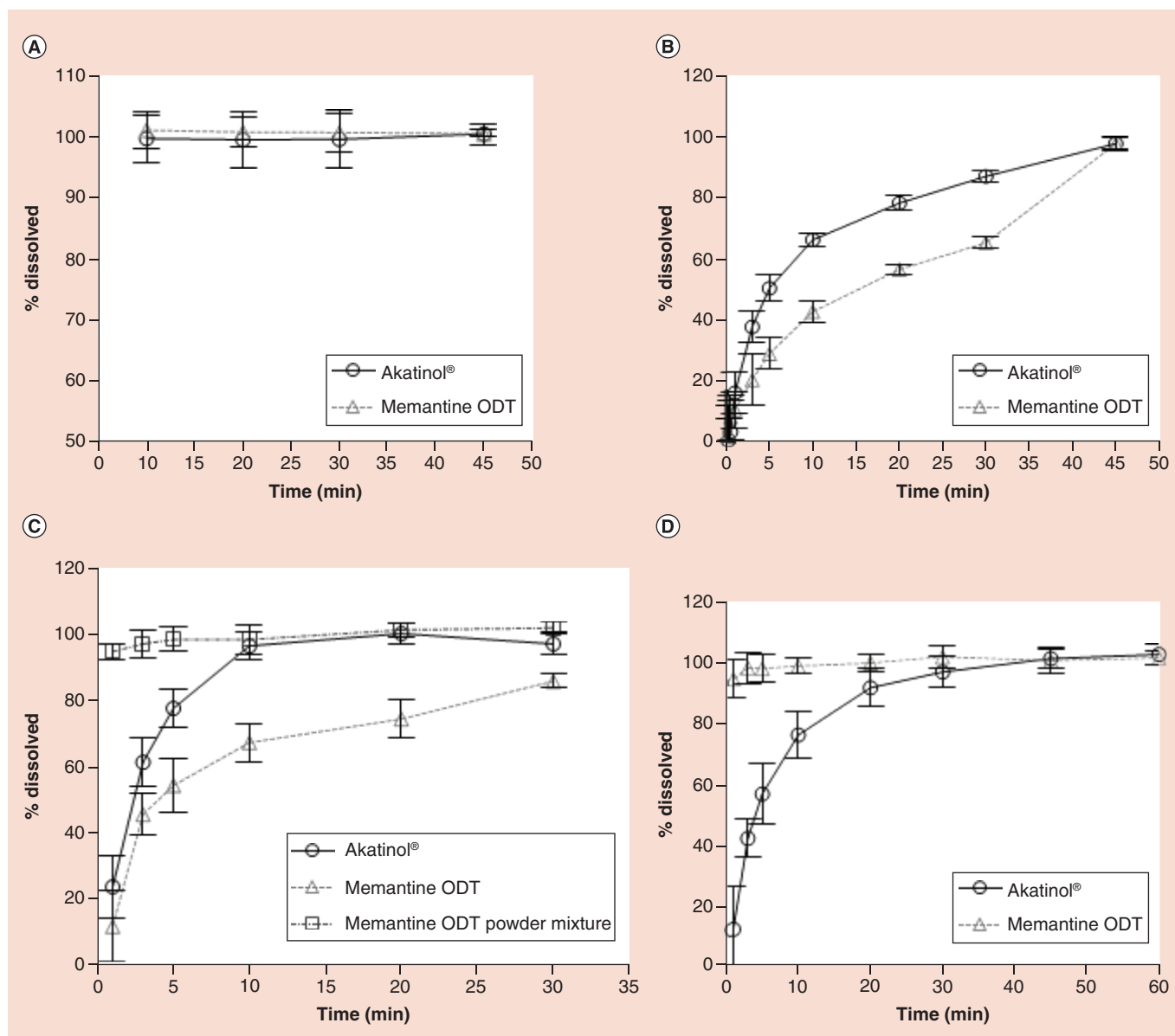


Figure 1. Dissolution profiles of memantine 20 mg orodispersible tablets and Akatinol® immediate release 20-mg tablets. (A) In 0.1 M HCl United States Pharmacopeia medium, having apparent similarities despite different mechanisms of delivery; (B) In 0.1 M HCl, NaCl and 0.1% Triton™ X-100 (pH = 1.2) as first 'physiological medium' approach; (C) In HCl 0.1 M, NaCl and 0.1% Tween™ 80 (pH = 1.2), including ODT powder mixture, in order to discriminate the influence of excipients or ODT compression on dissolution; (D) In simulated saliva as a disintegration step prior to the dissolution in 'C' conditions. ODT: Orodispersible tablet.

In order to mimic the normal conditions for ODT administration, we proposed to previously disintegrate the ODT in 1 ml of simulated saliva for 1 min, and then add the dispersed material into the Tween 80 dissolution media. It is noteworthy (Figure 1D) that dissolution profiles agree with the pharmaceutical formulations. While ODT possesses rapid and complete dissolution during the first times, the reference product demonstrates a humectation-disintegration period with gradual dissolution that at around 30 min is quite similar at the different ODT levels, due to which the memantine is considered a highly soluble molecule. It would be expected that such differences would not be relevant during the *in vivo* assay.

Comparative bioavailability trial

The concentration–time profiles of the 18 volunteers for memantine up to 72 h are presented in Figure 2. All

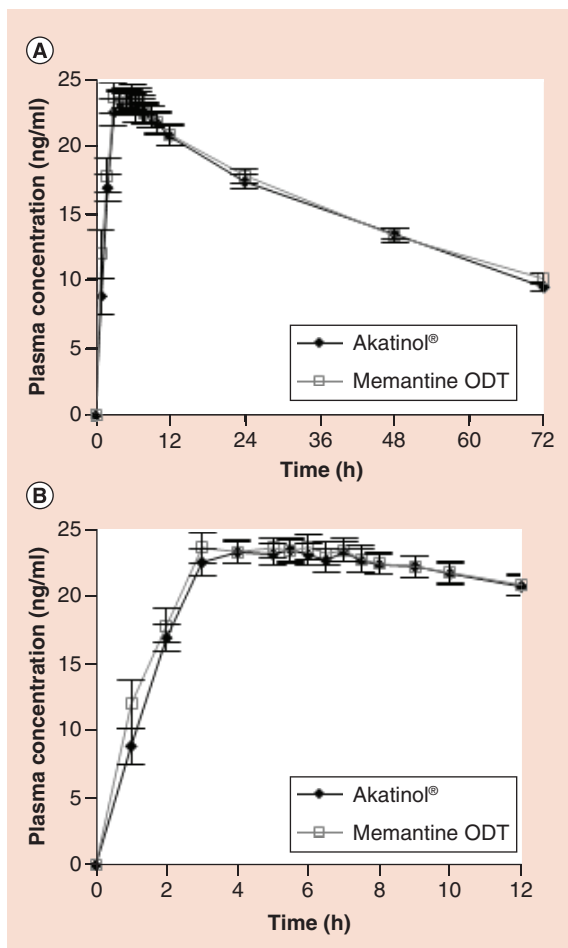


Figure 2. Memantine plasma concentration–time profile of 18 healthy Mexican volunteers, after an oral, single-dose administration of one 20 mg immediate release tablet of Akatinol® (reference product in Mexican market) or memantine orodispersible tablet (test product), under fasting conditions. (A) Full sampling truncated up to 72 h; (B) Pharmacokinetic profiles of the first 12 h. ODT: Orodispersible tablet.

Table 1. Memantine pharmacokinetic data after administration of a single oral dose of one 20-mg tablet to healthy Mexican volunteers under fasting conditions.

	Mean	SD	%CV	Minimal	Maximal
Memantine ODT					
T_{max} (h)	4.97	2.018	40.587	1	7.5
C_{max} (ng/ml)	25.491	4.655	12.261	17.226	34.638
k_e (h^{-1})	0.013	0.003	21.995	0.009	0.018
$t_{1/2}$ (h)	58.578	12.824	21.893	38.885	80.818
AUC_{0-72} (ng.h/ml)	1134.092	168.428	14.851	825.306	1446.796
Akatinol®					
T_{max} (h)	5	1.871	27.417	2	7.5
C_{max} (ng/ml)	24.931	3.346	13.421	17.384	29.808
k_e (h^{-1})	0.013	0.003	19.503	0.009	0.019
$t_{1/2}$ (h)	55.871	10.064	18.014	36.118	77.509
AUC_{0-72} (ng.h/ml)	1113.515	135.005	12.124	915.021	1378.009

ODT: Orodispersible tablet; SD: Standard deviation.

calculated pharmacokinetic (PK) parameters are summarized in Table 1. As can be noted, no significant differences were observed in terms of velocity of absorption and total amount absorbed (Table 2), respectively. Thus, during ODT formulation, it appears that oral disintegration and rapid dissolution in the bowel did not to exert any influence on the bioavailability of memantine.

Table 2. Statistics bioequivalence of memantine 20 mg orodispersible tablets and Akatinol® 20-mg immediate release tablets.

Parameter	(%) Intrasubject CV	90% Confidence intervals		Statistic power
		Lower	Upper	
C _{max} (ng/ml)	8.250	95.992	108.284	1.000
AUC _{0-72 h} (ng*h/ml)	5.510	100.232	111.015	1.000

Concerning pharmacokinetic data obtained in Mexican population, it is interesting to note differences with previously published information. In a healthy Indian population [14], the study participants were administered with a single oral dose of 10 mg under fasting conditions, reaching a mean C_{max} of 14.39 ng/ml, (approximately 44% less with the half dose used in this work), while T_{max} was 7.5 h with an elimination half-life of 49 h. Moreover, in a Brazilian study conducted under the same conditions, with a 10-mg oral dose, the C_{max} reported was 21.6 ng/ml (86.4% of C_{max} acquired in Mexican, but using one half of the dose), with a delayed T_{max} of 8 h and a shorter t_{1/2} of 43 h [18]. At last, the present data appear quite to those obtained in a Chinese trial [19], where the authors reported a C_{max} of 25.34 ng/ml, with a T_{max} of 6.8 h and a t_{1/2} of 62 h with a single oral dose of 20 mg.

Although it is known that memantine is not metabolized, all of these apparent demographic differences in bioavailability should be explored more thoroughly, and its clinical relevance must be discussed in the face of the new findings on its cellular mechanisms associated with the prevention of the expression of cell-adhesion molecules induced by proinflammatory signals in the endothelium of human brain microvasculature, which is linked to cognitive impairment and dementia during aging [20].

Palatability survey

The survey was fully validated employing placebo ODT with volunteer personnel of Pharmometrica, and no statistical effect of the sequence-of-administration in the responses was demonstrated.

The most concordant answers in terms of mean values in the analog-visual scale were (detected in decreasing order):

- ODTs have a nice flavor;
- ODTs did not leave an unpleasant aftertaste or sensation in the mouth;
- ODTs would be preferred over common tablets and other pharmaceutical forms, with higher compliance for prolonged treatments;
- ODTs are easily handled and did not break into the blister or in the fingers.

Conclusion

It might be considered that pharmacopeic dissolution conditions have quality-control purposes, and that in many of the cases, they do not have a discriminative capacity to distinguish differences in the delivery of the active pharmaceutical ingredients from the pharmaceutical formulation that could impact the bioavailability of the drugs. The development and adoption of the discriminative dissolution assay must resemble the physiological conditions, such as small volumes, slower agitation speeds, similar surface tension, pH and temperature, as well as consider a previous disintegration step in the case of ODT.

In the case of the ODT developed, they exhibited adequate palatability characteristics and were well accepted in a sample of healthy volunteers. Memantine ODTs were bioequivalent with the reference product and the pharmacokinetics of memantine in Mexican population exhibits slight differences with those previously reported in other populations.

With this biopharmaceutical development and human pharmacokinetic and palatability characterization, memantine ODT has established a new approach to be used as a dosage form with value proposition in concordance with EMA 'Quality aspects in the pharmaceutical development of medicines for older people'. Further research should be conducted in order to assess patient preference.

Future perspective

Considering the aging of global population, we must observe a trend in the development and commercialization of pharmaceutical formulations such as ODT, minipills, transdermic patches and so on for geriatric population.

During those developments, researchers must create *in vitro* assay that resembles as close as possible the physiological conditions during drug delivery. Such assays should include not only media (pH, salinity, osmolality, tensoactive presence and limitaintg volume), but also new apparatus that can simulate disintegration, bowel emptying, peristaltic motion and gastroenteric reabsorption. Adoption of these technologies will be able to generate stronger *in vitro–in vivo* correlations.

At last and concerning new insights in the cellular therapeutic mechanism of memantine, it is promissory that it could be used not only in the treatment of Alzheimer's disease, but also in other kinds of dementia and cognitive disorders.

Summary points

- Aging of global population has been accomplished by an increase in several kinds of dementia, including Alzheimer's disease.
- Modern public health policies must consider the design of pharmaceutical formulations suitable for older patients.
- Developed memantine orodispersible tablet complies with the quality aspects in the pharmaceutical development of medicines for older people.
- During formulation characterization, it is very convenient to develop biorelevant conditions during dissolution assays that mimic the physiological environment of the drug delivery, instead of pharmacopeic methodology.
- Memantine orodispersible tablet was bioequivalent to 20-mg immediate release tablet, having advantages in flavor and handling that may result in a better treatment compliance.

Financial & competing interests disclosure

This study was partially funded by Productos Científicos, SA de CV. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that the clinical protocol was reviewed and approved by an independent Ethics Committee. In addition, the authors obtained COFEPRIS approval for the conduction of present study. Volunteers signed informed consent, which was formulated according to the latest version of the Declaration of Helsinki (64th General Meeting, Fortaleza, Brazil; October 2013).

Open access

This work is licensed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

1. Instituto Nacional de las Mujeres. Situación de las personas adultas mayores en Mexico (2015). http://cedoc.inmujeres.gob.mx/documentos_download/101243.1.pdf
2. van Riet-Nales DA, Hussain N, Sundberg KA *et al.* Regulatory incentives to ensure better medicines for older people: from ICH E7 to the EMA reflection paper on quality aspects. *Int. J. Pharm.* 512(2), 343–351 (2016).
- **Shares the state-of-the-art of different approaches for new formulations directed to older patients.**
3. del Río-Sancho S, Serna-Jimenez CE, Sebastián-Morelló M *et al.* Transdermal therapeutic systems for memantine delivery. Comparison of passive and iontophoretic transport. *Int. J. Pharm.* 517(1–2), 104–111 (2017).
4. Fukui Y, Hishikawa N, Ichinose J *et al.* Different clinical effect of four antedementia drugs for Alzheimer's disease patients depending on white matter severity. *Geriatr. Gerontol. Int.* 17(11), 1765–2287 (2017).
- **Offers an actual landscape in the pharmacological treatment of Alzheimer's disease.**
5. Marinova Z, Chuang DM, Fineberg N. Glutamate-modulating drugs as a potential therapeutic strategy in obsessive-compulsive disorder. *Curr. Neuropharmacol.* 15(7), 977–995 (2017).
6. Jeevitha M, Pandey V. Formulation and development of orodispersible tablet of memantine hydrochloride. *Int. J. Drug Dev. Res.* 8(1), 38–41 (2016).

7. Deshpande KB, Ganesh NS. Orodispersible tablets: an overview of formulation and technology. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* 2(1), 726–734 (2011).
 8. Memantine hydrochloride tablets, In: *The United States Pharmacopeial*. USP 39 & NF 34, Rockville, MD, USA, 4716–474719 (2016).
 9. Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the *in vivo* dissolution of lipophilic compounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60(3), 413–417 (2005).
 10. Zolnik B, Burgess D. *In vitro–in vivo* correlation on parenteral dosage forms. In: *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. Rajesh K, Lawrence Y. (Eds.). Springer, Cham, Switzerland, 336–358 (2008).
 11. Marques M, Loebenberg R, Almakainzi M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolut. Technol.* 18(3), 15–28 (2011).
 12. Gupta AK, Patel PK, Vora JJ, Patel S. Analytical method validation of stability-indicating HPLC method for determination of assay of memantine hydrochloride tablets. *Int. J. Pharm. Pract. Drug Res.* 4(1), 12–14 (2014).
 13. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1–2013. www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013
 14. Lou HG, Yu LY, Ruan ZR, Jiang B, Chen JL. Quantitative determination of memantine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35(19), 2696–2705 (2012).
 15. Konda RK, Challa BR, Chandu BR, Chandrasekhar KB. Bioanalytical method development and validation of memantine in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry: application to bioequivalence study. *J. Anal. Methods Chem.* 2012(1), 1–8 (2012).
 16. Nilausen DO, Zuiker RG, van-Gerven J. The perception and pharmacokinetics of a 20-mg dose of escitalopram orodispersible tablets in a relative bioavailability study in healthy men. *Clin. Ther.* 33(10), 1492–1502 (2011).
 17. Oviedo H, Campa A. An approach to the use of Cronbach's alpha. *Rev. Colomb. Psiquiatr.* 34(4), 572–580 (2005).
 18. Costa-Cesar I, Duarte Byrro RM, Fernandes de Santana F *et al.* Bioequivalence study of two oral formulations of memantine tablets in healthy brazilian volunteers after a single dose administration. *J. Bioeq. Bioavail.* 4(2), 14–17 (2012).
 19. Liu MY, Meng SN, Wu HZ, Wang S, Wei MJ. Pharmacokinetics of single-dose and multiple-dose memantine in healthy chinese volunteers using an analytic method of liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin. Ther.* 30(4), 641–653 (2008).
 20. Wang F, Zou Z, Gong Y, Yuan D, Chen X, Sun T. Regulation of human brain microvascular endothelial cell adhesion and barrier functions by memantine. *J. Mol. Neurosci.* 62(1), 123–129 (2017).
- **Provides new insights of the molecular mechanisms of memantine.**