

Revisión

Peramivir

Un nuevo y potente inhibidor de la neuraminidasa para el tratamiento de las infecciones gripales

J. Reina

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca

INTRODUCCIÓN

Los virus de la gripe A y B son los agentes etiológicos de las epidemias anuales recurrentes de gripe que se producen a lo largo de la estación invernal. La gripe es una infección de vías respiratorias altas y bajas que se asocia a un síndrome febril y malestar general. Normalmente es una enfermedad leve y autolimitada, pero de gran importancia epidemiológica y social debido a su efecto sobre la población (1, 2).

La principal estrategia para la prevención de las infecciones por los virus gripales es la vacunación sistemática y repetida de la población susceptible. Como es bien sabido, las variaciones antigénicas menores del virus de la gripe A obligan a modificar anualmente la composición de las vacunas para poder desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada a cada nueva epidemia anual (2, 3).

Ante la elevada probabilidad de aparición y diseminación de una cepa gripal A pandémica (virus gripal aviario A H5N1) (4), las vacunas existentes no podrían utilizarse por no contener la nueva cepa, y además, el tiempo mínimo de respuesta para la preparación de una nueva vacuna se calcula entre seis y ocho meses (4, 5). Por lo tanto, la OMS recomienda realizar estudios sobre la eficacia de nue-

vos y diferentes fármacos antivirales para la profilaxis y el tratamiento de la población general frente a esta posible pandemia (6, 7).

La neuraminidasa de los virus de la gripe A y B es una glucoproteína codificada por el gen 6 (1413 nucleótidos y un peso molecular de 50.087 Da) situada en la envoltura externa del virus y con actividad enzimática (sialidasa) que hidroliza los radicales de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) existentes en los diferentes glucoconjugados de las membranas celulares. Esta actividad enzimática es esencial y determina la salida del virus de la célula infectada, favorece la diseminación viral (hidrolizando las secreciones mucosas del aparato respiratorio) y evita la formación de acúmulos virales no infectivos (2, 8, 9). Esta enzima se ha constituido en los últimos años como una de las dianas más importantes en la búsqueda de nuevos antivirales con eficacia antigripal.

ESTRUCTURA DEL PERAMIVIR

A partir de los estudios cristalográficos realizados en la neuraminidasa de diferentes virus gripales A y B y su co-cristalización con ácidos siálicos y con el análogo insatu-

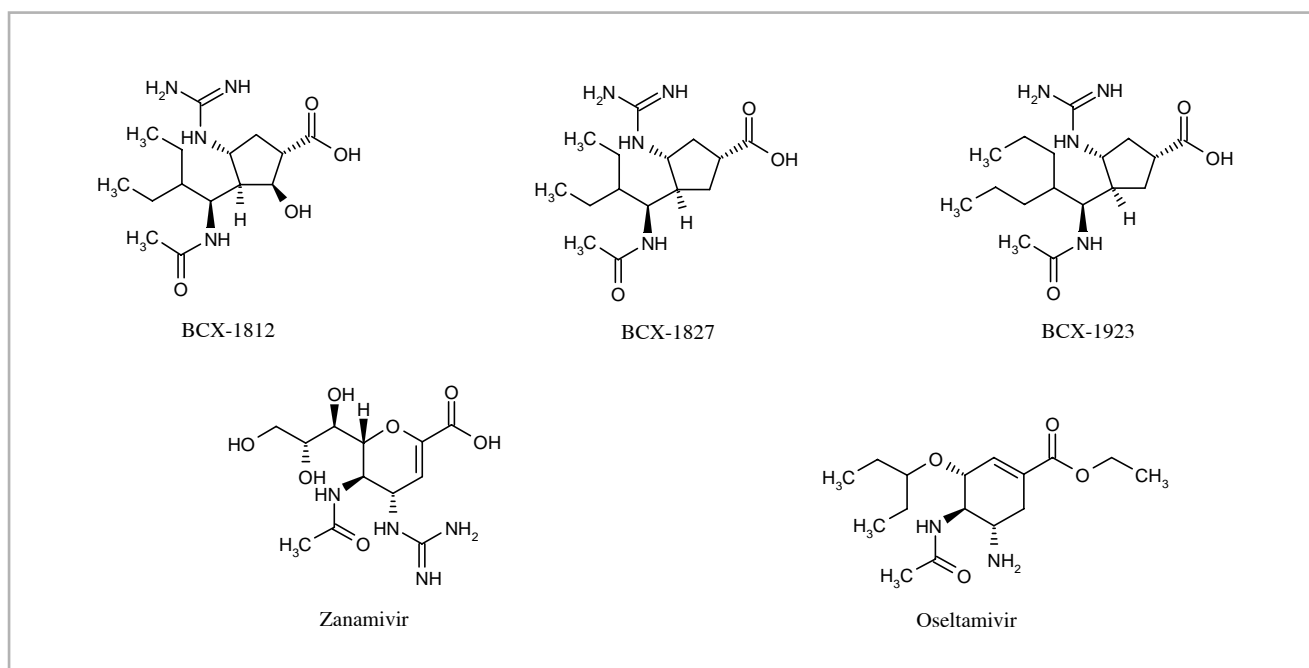


Figura 1. Estructura química de los diferentes fármacos inhibidores de la neuraminidasa de los virus gripales.

rado Neu5Ac2en, se han sintetizado varios análogos de éste como potentes inhibidores de dicha enzima (10, 11). La primera generación de estos inhibidores eran básicamente los 4-guanidino-Neu5Ac2en análogos (zanamivir y oseltamivir), y tanto en amplios estudios *in vitro* como en ensayos clínicos han mostrado su eficacia terapéutica y profiláctica frente a la mayoría de las infecciones gripales humanas (12-14).

El conocimiento de las características moleculares del centro activo de la neuraminidasa de los virus de la gripe ha permitido diseñar y desarrollar nuevos fármacos inhibidores de esta enzima. El centro activo de la neuraminidasa se caracteriza por presentar cuatro bolsillos de fijación en el centro activo: uno de tipo ácido en el cual tres restos de arginina forman puentes de hidrógeno con los ácidos carboxílicos; uno de tipo hidrofóbico formado por la cadena lateral del glicerol; otro de tipo hidrofóbico ocupado por el grupo acetamídico del ácido neuramínico; y uno cargado negativamente y ocupado por el grupo C4-hidroxil del ácido neuramínico (15, 16).

Con estos datos estructurales se diseñaron a partir del año 2000 unos compuestos químicos derivados ciclopentano que presentaban un grupo guanidino sustituyendo al C4-hidroxil y la adición de una cadena n-butil para interactuar con la cadena lateral del glicerol (Fig. 1). El primer derivado ciclopentano ensayado fue el designado RWJ-270201 (BCX-1812), que químicamente corresponde al ácido (1S,

2S, 3R, 4R)-3((1S)-(acetilamino)-2-etilbutil)-4(aminoiminoetil)amino)-2-hidroxi-ciclopentano carboxílico. Dentro de este nuevo grupo se incluyen en la actualidad los siguientes fármacos: peramivir (BCX-1812, RWJ-270201), BCX-1827 (RWJ-270204), BCX-1898 y BCX-1923 (15-21).

ESTUDIOS *IN VITRO*

Los primeros derivados ciclopentano mostraron una gran capacidad para inhibir de forma selectiva la actividad neuraminidasa de varias cepas del virus gripal A, con una concentración inhibitoria (CI_{50}) entre 0,09 y 1,4 nM (intervalo 0,82-10,8 nM) (22). Estos compuestos presentan una concentración efectiva de inhibición viral (inhibición replicativa) situada entre 0,01 y 1,5 μ M para los virus gripales A de los subtipos H1N1, H3N2 y H5N1, y entre 0,02 y 3 μ M para los virus gripales B en las infecciones experimentales realizadas en cultivos celulares (19, 23).

En los estudios *in vitro* el peramivir se ha mostrado en general igual de potente (valor de la IC_{50}) que el oseltamivir frente a la mayoría de las cepas gripales humanas (Tabla 1), excepto en el subtipo H1N1. Por otro lado, este antiviral ha resultado más potente que el zanamivir frente a los subtipos H3N2 y H2N2, y equivalente en el subtipo H1N1 (22, 23). Frente a las cepas del virus de la gripe B la potencia del peramivir ha sido similar a la del zanamivir y superior a la del oseltamivir (23, 24).

Tabla 1. Actividad comparada de los diferentes inhibidores de la neuraminidasa frente a las cepas gripales humanas.

	A(H1N1)	A(H2N2)	A(H3N2)	B
Peramivir	+++	+++	+++	+++
Oseltamivir	+	+++	+++	+
Zanamivir	+++	+	+	+++

Un estudio demostró el efecto sinérgico del tratamiento combinado con peramivir y ribavirina, tanto *in vitro* (cultivo celular) como *in vivo* (ratones), frente a la cepa gripal humana A(H1N1). Esta asociación no incrementa la toxicidad ni los efectos adversos y podría utilizarse en pacientes graves o inmunodeprimidos (25).

Smee y cols. (19) han estudiado la eficacia *in vitro* del peramivir frente a las cepas gripales A aviarias de los subtipos de alta patogenicidad H5N1 y H9N2. Han comprobado que este nuevo antiviral presenta una elevada potencia inhibitoria frente a las cepas tipo de estos subtipos (IC₅₀ 0,01-0,02 µM). Esta potencia es unas diez veces superior a la demostrada por el zanamivir y el oseltamivir (0,20-0,26 µM) (26). Los estudios realizados con cepas gripales aviarias de todos los subtipos de neuraminidasa conocidos (N1-N9) han mostrado la elevada potencia del peramivir (rango 0,9-4,3 µM), comparable, y sobre todo menos variable, a la de los otros inhibidores de la neuraminidasa (zanamivir [rango 2,7-30 µM] y oseltamivir [rango 1,9-69 µM]) (Tabla 2) (20, 23, 26). Se ha calculado que el peramivir es unas 15 veces más eficaz (diferencias entre la CI₅₀ máxima y mínima) que el zanamivir y unas 35 veces más que el oseltamivir frente a las neuraminidasas aviarias (26).

Tabla 2. Actividad inhibitoria (CI₅₀) comparada de los diferentes inhibidores de la neuraminidasa frente a las distintas neuraminidasas aviarias (20).

	Peramivir	Zanamivir	Oseltamivir
N1	2,6-3,4	5,8-20	36-53
N2	2,0-2,7	4,7-7,4	1,9-2,7
N3	3,1-3,8	4,9-5,9	2,9-3,3
N4	2,3-3,2	2,2-4,5	5,5-47
N5	1,2-2,7	2,7-14	33-37
N6	1,3-3,1	3,4-7,2	3,2-4,9
N7	1,5-4,3	5,9-7,2	4,4-8,2
N8	1,1-1,2	5,3-30	30-69
N9	0,9-1,6	10-12	9,5-18

ESTUDIOS EN ANIMALES

En los ratones infectados con los virus gripales A o B, el tratamiento oral con peramivir ha demostrado ser altamente efectivo para la prevención de la mortalidad, la disminución de la sintomatología de la enfermedad y la reducción del título viral (carga viral) en los tejidos pulmonares y las vías respiratorias. No se ha observado citotoxicidad de estos fármacos cuando se han utilizado a concentraciones tan elevadas como de 1 mM (328 g/ml) (15, 19) o 1000 mg/kg/día en ratones, o 100 mg/kg/día en hurones (22, 23, 27).

Los estudios farmacocinéticos realizados en ratones infectados han mostrado la igualdad de eficacia con la administración de la dosis total repartida en dos o tres veces al día o en dosis única, y como consecuencia de ello se ha recomendado, para los ensayos clínicos de terapia, la utilización de una dosis única diaria (20, 28, 29).

Sidwell y cols. (30) han realizado una serie de estudios sobre la eficacia terapéutica del peramivir en ratones inmunosuprimidos. En ellos comprobaron que la administración oral de 100 mg/kg/día durante cinco días determina un incremento significativo en el número de supervivientes y un descenso en la carga viral detectado en las vías respiratorias bajas. Con los resultados de estos estudios previos predicen la posibilidad de utilizar este nuevo inhibidor de la neuraminidasa para el tratamiento de los pacientes humanos infectados por los virus gripales. La eficacia profiláctica y terapéutica del peramivir ha mostrado ser máxima cuando, al igual que ocurre con los otros inhibidores de la neuraminidasa, se administra durante las primeras 48 horas del inicio de la sintomatología clínica gripal (12-14).

En ensayos posteriores, también realizados en ratones, se ha comprobado que una única inyección intramuscular de peramivir (10 mg/kg) reduce significativamente la morbilidad y la mortalidad en los ratones infectados con la cepa gripal A/H1N1; el empleo de oseltamivir en el grupo control no mostró ningún efecto significativo. Así mismo, se ha comprobado que una dosis intramuscular única de peramivir (2-20 mg/kg) es comparable a una terapia oral de cinco días con oseltamivir (2-20 mg/kg) en la profilaxis frente a las cepas gripales A/H3N2 y A/H1N1 (31).

Govorkova y cols. (26) han observado que la administración de 10 mg/kg/día de peramivir protege por completo (ausencia de replicación viral pulmonar y cerebral) a los ratones infectados experimentalmente con las cepas gripales aviarias H5N1 y H9N2 causantes de brotes en aves y humanos en 1997. Estos datos son comparables con los comunicados con el oseltamivir frente a estas mismas cepas aviarias (31).

RESISTENCIA

El empleo de los inhibidores de la neuraminidasa de primera generación (oseltamivir) ya ha determinado la aparición de cepas gripales resistentes, tanto humanas como aviarias. Los porcentajes de resistencia todavía son bajos, entre el 4% y el 8% en los niños y <1% en los adultos (12, 14, 32, 33). Sin embargo, su posible empleo masivo como profilaxis o terapia frente a una pandemia gripal podría determinar un incremento significativo del número de cepas resistentes, por lo que resulta imprescindible disponer de una alternativa terapéutica ante esta posibilidad (13, 14).

Los primeros estudios de utilización animal, especialmente los estudios *in vitro*, han demostrado la aparición de resistencia viral a los derivados ciclopentano, en particular al peramivir, en pases seriados sobre cultivos celulares con concentraciones subterapéuticas y progresivas de estos fármacos (34-37). Los primeros estudios de patogenicidad parecen indicar, sin embargo, que las cepas resistentes al peramivir se muestran menos virulentas y con menor capacidad de infección y transmisión entre animales de experimentación (37, 38).

En estos estudios se ha comprobado también que la aparición de la mutación His273Tyr en el gen de la neuraminidasa es uno de los principales determinantes de la resistencia al peramivir (38, 39). Los análisis realizados sobre modelos moleculares de la enzima parecen indicar que la His273 está relativamente distante (>5 Å) del sitio activo de la neuraminidasa para el peramivir, pero que la sustitución Tyr273 introduce un fenómeno de interacción repulsiva entre la enzima y su inhibidor, lo cual conferiría a la cepa gripal resistencia al peramivir. Otros autores han observado, en pases seriados, la sustitución Arg292Lys en el sitio activo de la neuraminidasa, también detectada con los otros inhibidores y que hace a las cepas menos virulentas (37, 40, 41).

Los derivados ciclopentano, a diferencia de los inhibidores clásicos, interactúan de forma distinta con los centros activos de la neuraminidasa, y este aspecto es especialmente importante para su eficacia frente a las cepas gripales resistentes a los fármacos utilizados hasta ahora. Así, el grupo guanidino del zanamivir interactúa con la posición Glu119 del centro activo; el peramivir también contiene este grupo, que ocupa el mismo sitio activo, pero con una orientación espacial diferente, y como consecuencia las cepas resistentes al zanamivir (Glu119/Gly o GluAla) se muestran totalmente sensibles al peramivir (37, 38). La sustitución de la His274 por Tyr o Phe determina resistencia al oseltamivir; esta misma mutación comporta una disminución en la sensibilidad al peramivir, pero unas diez veces menor que frente al oseltamivir (38-40). Las cepas

gripales con la sustitución Arg292/Lys presentan un bajo grado de resistencia (10 a 30 veces) al peramivir y al zanamivir, y muy elevada (5000 a 30.000 veces) al oseltamivir (37, 40, 41). Un dato preocupante es que la aparición de la sustitución Arg152/Lys, que determina interacciones no eficientes del grupo acetamido, comporta una resistencia cruzada entre zanamivir, oseltamivir y peramivir. Sin embargo, este tipo de sustitución todavía es de baja prevalencia entre las cepas gripales de pacientes y animales tratados con estos antivirales (40, 41).

ENSAYOS CLÍNICOS

Todavía no hay suficiente información clínica sobre la utilidad y la eficacia del peramivir en los seres humanos. En los escasos estudios de fase I realizados en humanos, para el análisis de seguridad y farmacocinéticos, se ha comprobado que el peramivir es bien tolerado tras la administración de una única o varias dosis orales de hasta 800 mg/kg/día. Tras su administración oral el peramivir se absorbe rápidamente, alcanzando el pico máximo plasmático transcurridas dos a cuatro horas. La vida media de eliminación plasmática es de 12 a 25 horas y el fármaco absorbido es eliminado exclusivamente por excreción renal (20, 29). Los efectos adversos observados en humanos voluntarios son similares a los detectados en el grupo placebo (39% frente a 37%), siendo los más frecuentes la cefalea (15%) y la faringitis (9%) (29, 42).

En los ensayos de fase II en humanos infectados previamente por los virus de la gripe A y B, destinados a conocer su seguridad, tolerabilidad y eficacia clínica, el peramivir ha reducido significativamente los títulos virales detectables en lavados nasales, sin que se hayan observado efectos adversos locales ni sistémicos. Los ensayos de fase III todavía están inconclusos, pero parece que los resultados van a ser muy alentadores (20, 29).

En resumen, el peramivir, un nuevo inhibidor de la neuraminidasa, ha mostrado en los estudios *in vitro*, en animales y en humanos, una elevada eficacia frente a la mayoría de los virus gripales conocidos, tanto humanos como aviarios. Por lo tanto, podría considerarse como el primer ejemplo de la segunda generación de estos inhibidores que podría utilizarse para la profilaxis y el tratamiento de la gripe epidémica y pandémica.

Correspondencia: Dr. Jordi Reina, Unidad de Virología, Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario Son Dureta, c/Andrea Doria nº 55, 07014 Palma de Mallorca. e-mail: jreina@hsd.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Betts, R.F. *Influenza virus*. En: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Eds.). Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York 1995; 1546-1567.
2. Murphy, B.R., Webster, R.G. *Orthomyxoviruses*. En: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). Fields Virology, 4th. Lippincott-Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia 2001; 1533-1579.
3. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiol Rev 1992; 56: 152-179.
4. Reina, J. *La gripe aviar. Una amenaza constante para el ser humano*. Med Clin (Barc) 2004; 122: 339-341.
5. Monto, A.S., Iacuzio, D.A., LaMontagne, J.R. *Pandemic influenza. Confronting a reemergent threat*. J Infect Dis 1997; 176: 1-3.
6. Hampson, A.W. *Surveillance for pandemic influenza*. J Infect Dis 1997; 176: S8-13.
7. Palese, P., Zavala, F., Muster, T., Nussenzweig, R.S., García-Sastre, A. *Development of novel influenza virus vaccine and vectors*. J Infect Dis 1997; 176: S45-49.
8. Monto, A.S. *Prospects for pandemic influenza control with currently available vaccines and antivirals*. J Infect Dis 1997; 176: 32-37.
9. Lamb, R.A., Krug, R.M. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). Fields Virology, 4th. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001; 1487-1532.
10. Burmeister, W.P., Ruigrok, R.W., Cusack, S. *The 2.2A resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid*. EMBO J 1992; 11: 49-56.
11. Varhese, J.N., McKimm-Breschkin, J.L., Caldwell, J.B., Kortt, A.A., Colman, P.M. *The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor*. Proteins 1992; 14: 327-332.
12. Oxford, J. *Oseltamivir*. Drugs Context 2004; 1: 313-356.
13. Reina, J. *Profilaxis y tratamiento de las infecciones respiratorias causadas por los virus influenza A y B*. Rev Esp Quimioterap 1999; 12: 23-29.
14. Reina, J. *Inhibidores de la neuraminidasa y su potencial utilización en la pandemia de gripe aviar*. Med Clin (Barc) 2005; 125: 780-783.
15. Babu, Y.S., Chand, P., Bantia, S. y cols. *BCX-1812 (RWJ-270201): Discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design*. J Med Chem 2000; 43: 3482-3486.
16. Calfee, D.P., Hayden, F.G. *New approaches to influenza chemotherapy: Neuraminidase inhibitors*. Drugs 1998; 56: 537-553.
17. Kim, C.U., Chen, X., Mendel, D.B. *Neuraminidase inhibitors as anti-influenza virus agents*. Antiviral Chem Chemother 1999; 10: 141-154.
18. Gubareva, L.V., Kaiser, L., Hayden, F.G. *Influenza virus neuraminidase inhibitors*. Lancet 2000; 355: 827-835.
19. Smee, D.F., Huffman, J.H., Morrison, A.C., Barnard, D.L., Sidwell, R.W. *Cyclopentane neuraminidase inhibitors with potent in vitro anti-influenza virus activities*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 743-748.
20. Young, D., Fowler, C., Busk, K. *RWJ-270201 (CX-1812): A novel neuraminidase inhibitor for influenza*. Phil Trans R Soc Lond Biol Sci 2001; 356: 1905-1913.
21. Sidwell, R.W., Smee, D.F. *Peramivir (BCX-1812, RWJ-270201): Potential new therapy for influenza*. Expert Opin Investig Drugs 2002; 11: 859-869.
22. Bantia, S., Parker, C.D., Ananth, S.L. y cols. *Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ-270201 with those of oseltamivir and zanamivir*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1162-1167.
23. Sidwell, R.W., Smee, D.F., Huffman, J.H. y cols. *In vivo influenza virus-inhibitory effects of the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 749-757.
24. Roberts, N.A. *Treatment of influenza with neuraminidase inhibitors: Virological implications*. Phil Trans R Soc Lond Biol Sci 2001; 356: 1895-1897.
25. Smee, D.F., Bailey, K.W., Morrison, A.C., Sidwell, R.W. *Combination treatment of influenza A virus infections in cell culture and in mice with the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201 and ribavirin*. Chemotherapy 2002; 48: 88-93.
26. Govorkova, E.A., Leneva, I.A., Goloubeva, O.G., Bush, K., Webster, R.G. *Comparison of efficacies of RWJ-70201, zanamivir and oseltamivir against H5N1, H9N2 and other avian influenza viruses*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2723-2732.
27. Sweet, C., Jakerman, K.J., Bush, K. y cols. *Oral administration of cyclopentane neuraminidase inhibitors protects ferrets against influenza virus infection*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 996-1004.
28. Drusano, G.L., Preston, S.L., Smee, D., Bush, K., Bailey, K., Sidwell, R.W. *Pharmacodynamic evaluation of RWJ-270201, a novel neuraminidase inhibitor, in a lethal murine model of influenza predicts efficacy for once-daily dosing*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2115-2118.
29. Iyer, G.R., Liao, S., Massarella, J. *Population analysis of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of RWJ-270201 (BCX-1812) in treating experimental influenza A and B virus in healthy volunteers*. Pharm Sci 2002; 4: E22.
30. Sidwell, R.W., Bailey, K.W., Morrey, J.D., Wing, M.H., Baldwin, T.J., Smee, D.F. *Inhibition of influenza virus infections in immunosuppressed mice with orally administered peramivir (BCX-1812)*. Antiviral Res 2003; 60: 17-25.
31. Bantia, S., Arnold, C.S., Parker, C.D., Upshaw, R., Chand, P. *Anti-influenza virus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection*. Antiviral Res 2006; 69: 39-45.
32. Stilianakis, N.L., Perelson, A.S., Hayden, F.G. *Drug resistance and influenza pandemics*. Lancet 2002; 359: 1862-1863.
33. McKimm-Breschkin, J., Trivedi, T., Hampson, A. y cols. *Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2264-2272.
34. Jackson, H.C., Roberts, N., Wang, Z.M., Belshe, R. *Management of influenza: Use of new antivirals and resistance in perspective*. Clin Drug Invest 2000; 20: 447-454.
35. McKimm-Breschkin, J.L. *Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors*. Antiviral Res 2000; 47: 1-17.
36. Gubareva, L.V., Webster, R.G., Hayden, F.G. *Cross resistance of influenza virus mutants to NA inhibitors: Zanamivir, GS4071 and RWJ-270201*. Antiviral Res 2000; 46: A54.
37. Bantia, S., Ananth, S., Horn, L. y cols. *Generation and characterization of a mutant of influenza A virus selected with the neuraminidase inhibitor RWJ-270201*. Antiviral Res 2000; 46: A60.

38. Gubareva, L.V., Webster, R.G., Hayden, F.G. *Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3403-3408.
39. Smee, D.F., Sidwell, R.W., Morrison, A.C., Bailey, K.W., Baum, E.Z., Wagaman, P.C. *Characterization of an influenza A (H3N2) virus resistant to the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201.* Antiviral Res 2001; 52: 251-259.
40. Baum, E.Z., Wagaman, P.C., Ly, L. y cols. *A point mutation on influenza B neuraminidase confers resistance to peramivir and loss of slow binding.* Antiviral Res 2003; 59: 13-22.
41. Mishin, V.P., Hayden, F.G., Gubareva, L.V. *Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors.* Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4515-4520.
42. Johnson, R.W. Pharmaceutical Research Institute, Raritan, New Jersey, USA 2000.