

De minister van Volkshuisvesting,
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 17 december 2008
KENMERK CGM/081215-01
ADVIES Inschaling van tamiflu-resistente gg-H1N1 virussen

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de wijziging van vergunning IG 99-090/09 met de titel "Onderzoek naar Influenza virus" van het Erasmus Universitair Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

Oseltamivir (tamiflu) wordt beschouwd als een belangrijk antiviraal middel om de impact van een uitbraak van een pandemische influenzavariant te beperken. Tot voor kort was de incidentie van oseltamivir-resistentie onder influenza virussen laag en was het effect van oseltamivir bij een pandemie gewaarborgd. Tijdens het seizoen 2007-2008 is bij het influenza A subtype H1N1 het percentage oseltamivir-resistente virussen in Nederland echter onverwacht gestegen tot 27%. Deze plotselinge ontwikkeling van resistentie kan implicaties hebben voor het nut van oseltamivir.

Bij de ontwikkeling van oseltamivir resistentie zijn minimaal twee puntmutaties in het zogenaamde neuraminidase (NA) enzym van het influenza virus betrokken. De aanvrager wil het effect van deze twee mutaties en eventuele additionele puntmutaties in het NA gen onderzoeken om de plotselinge toename van oseltamivir-resistentie te kunnen verklaren. Hij wil deze mutaties aanbrengen in veldisolaten van het H1N1 virus uit de periode 2006-2007 en 2007-2008. De aanvrager heeft verzocht om de voorgenomen *in vitro* handelingen uit te mogen voeren op ML-II inperkingsniveau.

In onderhavige studie is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu op ML-II inperkingsniveau alleen gewaarborgd kan worden als de te construeren recombinante H1N1 virussen voldoen aan twee voorwaarden. Ten eerste dienen de aan te brengen punt-mutaties in het NA gen beperkt te zijn tot mutaties die voorkomen in de huidige circulerende laagpathogene H1N1 virussen. Bovendien moet voorkomen worden dat de mutaties ertoe leiden dat het recombinant virus naast de oseltamivir-resistentie, tevens resistentie verwerft tegen een ander antiviraal middel. Met inachtneming van gestelde voorwaarden, inperkingmaatregelen en enkele aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de geplande *in vitro* handelingen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Inschaling van tamiflu-resistente gg-influenza A (H1N1) virussen

COGEM advies CGM/081215-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een verzoek tot wijziging van de vergunning IG 99-090 getiteld 'Onderzoek naar influenza virus'. De aanvrager is voornemens het effect van puntmutaties in het zogenaamde neuraminidase enzym van influenza A H1N1 virussen, die geïsoleerd zijn in de seizoenen 2006-2007 en 2007-2008 te analyseren.

Elke winter breken er onder de bevolking epidemieën uit die onder andere worden veroorzaakt door de influenza A virussen H1N1 en H3N2. Bij de behandeling van patiënten die geïnfecteerd zijn met een dergelijk influenza virus zijn een aantal antivirale middelen beschikbaar, zoals oseltamivir, zanamivir, amantadine en rimantadine.

Oseltamivir, beter bekend onder de naam tamiflu, wordt in Nederland zelden gebruikt voor de reguliere behandeling van een influenzainfectie. In Nederland wordt het alleen in speciale situaties ingezet, zoals bij een influenza-uitbraak in verpleegtehuizen en voor de behandeling van immuun-gecompromiteerde grieppatiënten (1). Ook wordt oseltamivir gezien als een belangrijk middel om de impact van een eventuele uitbraak van een pandemische influenza variant te beperken. Met het oog op het waarborgen van de effectiviteit van oseltamivir bij een toekomstige influenza uitbraak, is men alert op het ontstaan van oseltamivir-resistente influenza virussen.

De incidentie van oseltamivir-resistente virussen was tot voor kort zeer laag. Tot en met het influenzaseizoen 2006-2007 lag het percentage van oseltamivir resistente virussen van het subtype H1N1 tussen 0 en 1%. In het seizoen 2007-2008 is er echter een onverwacht hoog percentage oseltamivir-resistente virussen aangetroffen (27%).

De aanvrager wil onderzoeken welke mutaties verantwoordelijk zijn voor deze plotselinge toename van oseltamivir-resistentie in het influenza A virus H1N1 en wat het effect van deze mutaties is op de replicatie en de transmissie eigenschappen van het virus.

Influenza A virussen

Het influenzavirus, in de volksmond beter bekend als griepvirus, behoort tot de familie van *Orthomyxoviridea* en wordt onderverdeeld in drie typen: Influenza A, B en C (1,3). Het genoom van het influenza A virus bestaat uit acht unieke genoomsegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA). Het HA is betrokken bij de aanhechting van het virus aan een gastheercel, NA bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit de geïnfecteerde cel (4). Tevens spelen ze beide een rol bij de aanmaak van antistoffen tegen het virus. Classificatie vindt plaats op basis van de vóórkomende HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor influenza A virus zestien verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en negen verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9).

Door mutaties en het uitwisselen van genoomsegmenten tussen influenzavirussen kunnen laagpathogene influenzavirussen evolueren tot hoogpathogene virussen. Dit proces heeft in het verleden al diverse hoogpathogene influenzavirussen doen ontstaan die verschillende pandemieën hebben veroorzaakt, zoals de Spaanse griep in 1918 (subtype H1N1), de Aziatische griep in 1957 (subtype H2N2) en de Hongkong griep in 1968 (subtype H3N2) (5,6). Bovendien heeft het hoogpathogene influenzavirus type H5N1 in Azië verscheidene slachtoffers geëist bij uitbraken in 1997 en 2005 en heeft het influenza subtype H7N7 in Nederland en België een uitbraak van de vogelgriep veroorzaakt in 2003 (7,8,9). Belangrijk is hierbij aan te tekenen dat tijdens de Aziatische uitbraken het influenzavirus direct van vogels op mensen werd overgedragen en mogelijk ook direct van mens op mens (5,6).

Eerder COGEM advies

Gezien de eenvoudige wijze waarop influenza A virussen tot hoogpathogene stammen kunnen transformeren en het feit dat influenza A virussen een potentieel gezondheidsrisico inhouden voor mens en dier, heeft de COGEM in 2004 geadviseerd activiteiten met genetisch gemodificeerde (gg-) influenza A virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 3 (10).

De COGEM heeft inmiddels verschillende malen geadviseerd over werkzaamheden met gg-influenza A virussen. In deze adviezen heeft zij gesteld dat handelingen met gg-influenza A virussen ingeschaald dienen te worden op ML-III of DM-III niveau.

Als uitzondering op deze regel heeft de COGEM geoordeeld dat de laboratoriumwerkzaamheden met virussen bestaande uit minimaal zes of zeven gensegmenten van het geattenuëerde influenzatype A/PR/8/34 of A/SWN/33 (beide H1N1) en een of twee gensegmenten van andere influenzavirussen onder inperkingsniveau ML-II uitgevoerd kunnen worden (14). Hierbij is onder andere als voorwaarde gesteld dat het hemagglutinine geen polybasische klievingsplaats mag bevatten, aangezien deze klievingsplaats een belangrijke determinant blijkt te zijn voor de pathogeniteit van virussen van subtypen H5 en H7 (11). Daarnaast heeft de COGEM geadviseerd de werkzaamheden met een recombinant influenzavirus waarvan zes gensegmenten afkomstig zijn van de stam A/Leningrad/134/17/57 (Len17; H2N2) en twee segmenten van het H5N1 virus A/Indonezia /5/05 op ML-II niveau in te schalen (12). Ook in het geval van deze recombinant influenza virussen werd als voorwaarde gesteld dat ze geen hemagglutinine met polybasische klievingsplaats bevatten.

Om de risico's tijdens laboratoriumwerkzaamheden met gg-influenza A virussen op ML-II inperkingsniveau verder te beperken, heeft de COGEM tevens een aantal aanvullende voorschriften geadviseerd (13, 14):

- Open handelingen dienen plaats te vinden in een veiligheidskabinet klasse-II
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden
- Het dragen van handschoenen is verplicht
- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen of gevaccineerd te zijn.

In een advies waarbij geëmbryoneerde kippeneieren werden geïnfecteerd met gg-influenza A virussen heeft de COGEM aan bovenstaande voorschriften de volgende twee voorschriften toegevoegd (12,14):

- De geïnfecteerde eieren dienen in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed te worden
- De dozen dienen uitsluitend in een veiligheidskabinet klasse-II geopend te worden en bij eventuele breuk van een ei dient de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd te worden.

Voor werkzaamheden met proefdieren in combinatie met gg-influenza A virussen heeft de COGEM geadviseerd deze te verrichten op een DM-III inperkingsniveau met toevoeging van het voorschrift dat de dieren in onderdrukisolatoren gehuisvest dienen te worden (14).

Geplande werkzaamheden en adviesvraag

De oseltamivir-resistente virussen die in het seizoen 2007-2008 zijn aangetroffen hebben mutaties in het neuraminidase enzym op aminozuur positie 274 en 354 (19). Het betreft hier respectievelijk de mutatie H274Y en D354G. Van de H274Y mutatie was reeds bekend dat deze oseltamivir-resistentie veroorzaakt. Deze mutatie werd echter alleen aangetroffen in patiënten die werden behandeld met oseltamivir of in het geval van *in vitro* experimenten. In het seizoen 2007-2008 wordt deze mutatie plotseling in 27% van de circulerende H1N1 virussen getolereerd zonder dat er een verband gelegd kan worden met het gebruik van oseltamivir. De aanvrager suggereert dat de aminozuurverandering op positie 354 mogelijk een compensatoir effect heeft op de fitness van de virussen met de H274Y mutatie.

Om het effect van mutaties in het neuraminidase te kunnen onderzoeken wil de aanvrager met behulp van *reverse genetics* recombinante influenza virussen produceren. De aanvrager is in ieder geval van plan de aminozuren op positie 274 en 354 van het neuraminidase te veranderen in de veldisolaten uit het seizoen 2006-2007 en 2007-2008. Naast deze twee mutaties zijn er mogelijkwerwijs additionele mutaties betrokken bij de plotselinge tolerantie van oseltamivir-resistentie. Indien het mutaties betreft in het NA gen, wil de aanvrager ook de invloed van deze mutaties onderzoeken.

De aan te brengen mutaties zijn beperkt tot het NA gen en er zullen geen reassortanten van de verschillende veldisolaten worden geproduceerd. Van de ontwikkelde recombinante virussen zal de resistentie worden bepaald en zal geanalyseerd worden wat het effect is van de mutaties op de replicatie van het virus. Tevens zal er met behulp van de gecreëerde mutanten in fretten worden onderzocht wat de invloed is van de mutaties op de transmissie efficiëntie in deze dieren.

De aanvrager heeft verzocht de *in vitro* werkzaamheden met veldisolaten van influenza A H1N1 virussen uit het seizoen 2006-2007 en 2007-2008 en hiervan afgeleide mutanten te mogen uitvoeren op ML-II-niveau. De

proefdierexperimenten met beschreven genetisch gemodificeerde (gg-) of wild type influenza A H1N1 virussen wil de aanvrager uitvoeren op DM-III niveau.

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de beschreven studies. In het bijzonder is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van de *in vitro* werkzaamheden en de eventueel daarbij te hanteren aanvullende voorschriften.

Overwegingen en advies

De COGEM heeft twee maal geadviseerd de werkzaamheden met gg-influenza A virussen omlaag te schalen naar een ML-II inperkingsniveau (12,14). In deze gevallen werd er gebruik gemaakt van verzwakte influenzastammen. De COGEM is van mening dat de H1N1 veldisolaten en met name de oseltamivir-resistente isolaten die de aanvrager wil gaan gebruiken, niet kunnen worden aangemerkt als verzwakte influenzastammen. De plotselinge toename in de prevalentie van de oseltamivir-resistente H1N1 virussen geeft aan dat de opgetreden mutatie(s) er toe leidt dat deze virussen zich beter verspreiden dan virussen die deze mutatie(s) niet hebben. De aanvrager onderschrijft dit met epidemiologische surveillance data waaruit kan worden afgeleid dat de oseltamivir-resistente H1N1 virussen een verhoogde fitness lijken te hebben ten opzichte van de oseltamivir-gevoelige virussen.

Daar staat tegenover dat dit type humane H1N1 virussen al enige tijd onder de bevolking circuleert. De COGEM acht het hierdoor waarschijnlijk dat de bevolking regelmatig in aanraking zal zijn gekomen met deze virussen zonder dat dit tot een massale griepuitbraak heeft geleid. Om deze reden is de World Health Organization (WHO) van mening dat de humane H1N1 virussen van afgelopen seizoenen geen pandemie kunnen veroorzaken. In het influenzaseizoen 2007-2008 zijn er in totaal 1077 oseltamivir resistente influenza A H1N1 virussen gemeld bij de WHO (15). Op basis van de beschikbare informatie stelt de WHO dat de oseltamivir-resistente virussen een vergelijkbaar ziektebeeld geven als de niet-resistente H1N1 stammen (16). De H1N1 virussen zijn overdraagbaar van mens op mens. De WHO heeft echter geen aanwijzingen gevonden dat de transmissie-efficiëntie van de oseltamivir-resistente H1N1 virussen hoger is dan die van de niet-resistente varianten. Op

basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat het hier laagpathogene H1N1 influenza A virussen betreft.

In de onderhavige aanvraag is de aanvrager voornemens gg-influenza A virussen te construeren waarin de mutaties beperkt blijven tot het NA gen. De COGEM is van mening dat het niet-structurele eiwit NS1, de polymerase eiwitten PA, PB1 en PB2 en het HA en NA tezamen verantwoordelijk zijn voor de virulentie van het influenza virus (17). De specificiteit van NA en daarbij de rol van dit enzym in de mogelijke pathogeniteit van influenza is echter nauw verweven met de specificiteit van HA (18). Gezien dit feit is de COGEM van mening dat de uiteindelijke pathogeniteit van het gg-influenza virus slechts beperkt wordt beïnvloed door mutaties in het NA gen alleen.

In eerste instantie wil de aanvrager gg-influenza A virussen maken door in het gen dat codeert voor NA een puntmutatie aan te brengen op positie 274 al dan niet in combinatie met een puntmutatie op positie 354. Deze mutaties zijn aangetroffen in de oseltamivir-resistente H1N1 influenza virussen uit het seizoen 2007-2008 (19). Gezien de door de WHO genoemde eigenschappen van deze van nature voorkomende H1N1 virussen, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat deze puntmutaties zullen leiden tot een virus met een hogere pathogeniteit dan de thans in de bevolking voorkomende influenza H1N1 varianten.

De aanvrager heeft verzocht naast bovengenoemde mutaties ook andere puntmutaties in het NA gen van de H1N1 virussen aan te mogen brengen. De COGEM kan niet uitsluiten dat als gevolg van additionele puntmutaties een variant ontstaat die pathogener is dan de thans in de bevolking voorkomende influenza H1N1 varianten. De twee puntmutaties op positie 274 en 354 lijken immers al tot een verhoogde fitness te leiden. Echter, indien de aan te brengen puntmutaties beperkt blijven tot mutaties die zijn aangetroffen in de huidige populatie van circulerende laagpathogene H1N1 varianten, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de te construeren mutanten een fitness en/of pathogeniteit hebben die hoger is dan de thans in de bevolking voorkomende influenza H1N1 varianten.

Om de veiligheid van mens en milieu te kunnen waarborgen hecht de COGEM grote waarde aan vaccinatie en de inzetbaarheid van de drie antivirale middelen zanamivir, amantadine en rimantadine voor de behandeling van een eventueel optredende infectie. Aangezien zanamivir en oseltamivir hun antivirale

werking ontleen aan de binding van hetzelfde deel van neuraminidase, kan de COGEM niet uitsluiten dat bepaalde additionele puntmutaties in het NA gen zullen leiden tot het ontstaan van een dubbele resistentie.

De antivirale middelen amantadine en rimantadine grijpen aan op een zogenaamd ion-kanaal dat wordt gecodeerd door het M2 gen van het virus. Aangezien de voorgenomen additionele puntmutaties zich beperken tot het NA gen, acht de COGEM het niet waarschijnlijk dat de werking van deze middelen beïnvloed zal worden. Zij wijst er echter wel op dat verandering van een enkele nucleotide in het M2 gen al resistentie geeft tegen beide antivirale middelen (20). Deze verandering heeft geen nadelige invloed op de transmissie en pathogeniteit van het virus. Om mogelijke risico's van een eventuele infectie te minimaliseren acht de COGEM het derhalve van belang dat de aan te brengen puntmutaties, afgezien van de oseltamivir-resistentie geen resistentie opleveren tegen zanamivir, amantadine, rimantadine of andere antivirale middelen. De voorgenomen vaccinatie van de medewerkers zal eventuele risico's nog verder beperken.

Gezien bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM de voorgenomen *in vitro* handelingen met afgeleiden van influenza A H1N1 veldisolaten uit de periodes 2006-2007 en 2007-2008, waarin puntmutaties zijn aangebracht op positie 274 en/of 354 omlaag te schalen naar een ML-II inperkingsniveau. Voor additionele puntmutaties in het NA gen in de beschreven influenza A H1N1 virussen acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu onder ML-II inperkingsniveau alleen gewaarborgd als de puntmutaties beperkt blijven tot mutaties die worden aangetroffen in de huidige populatie van circulerende laagpathogene H1N1 varianten. Bovendien acht zij de voorwaarde noodzakelijk dat er geen additionele mutaties geïntroduceerd worden, waarvan op basis van de actuele wetenschappelijke kennis verwacht kan worden dat ze kunnen resulteren in resistentie tegen andere antivirale middelen dan oseltamivir. In het geval dat de betreffende mutaties in het NA gen zouden kunnen leiden tot een gelijktijdige resistentie tegen oseltamivir en een ander antiviraal middel is de COGEM van mening dat betreffende werkzaamheden op ML-III inperkingsniveau uitgevoerd dienen te worden.

Conform eerdere adviezen, is de COGEM van mening dat de volgende aanvullende voorschriften toegevoegd dienen te worden om eventuele risico's verder te beperken:

- Open handelingen dienen plaats te vinden in een veiligheidskabinet klasse-II
- Het dragen van handschoenen is verplicht
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden
- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen humaan Influenza A virus
- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen.

Voor de infectie van geëmbryoneerde kippeneieren met gg-influenza A virussen adviseert de COGEM aan bovenstaande voorschriften de volgende twee voorschriften toe te voegen:

- De geïnfecteerde eieren worden in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed
- De dozen worden uitsluitend in een veiligheidskabinet klasse-III geopend en bij eventuele breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

Conclusie

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu van het omlaag schalen naar ML-II inperkingsniveau van de voorgenomen *in vitro* handelingen met gg-influenza A virussen verwaarloosbaar klein als wordt voldaan aan de volgende voorwaarden. Ten eerste dient de modificatie van genoemde influenza A H1N1 veldisolaten zich te beperken tot het NA gen, waarbij alleen puntmutaties worden aangebracht die ook worden aangetroffen in de huidig circulerende laagpathogene H1N1 virus varianten. Bovendien dient voorkomen te worden dat naast de oseltamivir-resistentie een tweede resistentie wordt geïntroduceerd.

Conform eerder adviezen acht de COGEM het hierbij van belang dat een aantal aanvullende voorschriften worden gehanteerd. Met inachtneming van

gestelde voorwaarden, inperkings-maatregelen en aanvullende voorschriften, is de COGEM van mening dat de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd is.

Over de mogelijke implicaties van dit advies voor de inschaling van werkzaamheden met andere influenzavarianten en/of mutaties in een ander gensegment zal de COGEM zich binnenkort nader beraden.

Referenties

1. Rimmelzwaan GF *et al.* (2008) Het influenzaseizoen 2007/'08 in Nederland: antigeen variatie, resistentie tegen oseltamivir en de vaccinsamenstelling voor het seizoen 2008/'09. *Ned Tijdschr Geneesk* **152**:2138-2144
2. Knipe MD and Howley PM (2001) *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
3. Van Regenmortel MH (2000) Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
4. Brown EG (2000) Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**: 196-209
5. Palese P (2004) Influenza: old and new threats. *Nat Med* **10**: S82-87
6. Lipatov AS *et al* (2004) Influenza: emergence and control. *J Virol* **78**, blz. 8951-9
7. Claas EC *et al.* (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* **351**: 472-477
8. Hatta M *et al.* (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**: 1840-1842
9. Koopmans M *et al.* (2004). Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* **363**: 587-593
10. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen (CGM/040326-03)
11. World Health Organization (WHO) (2005). WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines. <http://www.who.int/biologicals/publications/ECBS%202005%20Annex%205%20Influenza.pdf>
12. COGEM (2007) Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. (CGM/070510-02)
13. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen (CGM/061214-01)
14. COGEM (2005). Pathogeniteitsstudies met recombinante Influenza A virussen (CGM/050201-01)

15. World Health Organization (2008) Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir. Internet: http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_summary/en/index.html (15-12-2008)
16. World Health Organization (2008) WHO/ECDC frequently asked questions for oseltamivir resistance. Internet: http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_faqs/en/index.html (15-12-2008)
17. Wit de E and Fouchier RAM (2008) Emerging influenza. *J. Clin. Virol.* **41**:1-6
18. Zambon MC (2001) The pathogenesis of influenza in humans. *Rev. Med. Virol.* **11**:227-241
19. Rameix-Welt M *et al.* (2008) Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathogens* **4**:e1000103
20. Fleming DM (2001) Managing influenza: amantadine, rimantadine and beyond. *Int. J. Clin. Pract.* **55**:189-195