

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА МЕФЛОХИН В ОТНОШЕНИИ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

К. Н. Филин¹, И. А. Берзин², В. Н. Быков¹, В. Д. Гладких¹, С. Я. Логинова³, С. В. Савенко³, В. Н. Щукина³

¹ Федеральное государственное унитарное предприятие Научно-производственный центр «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства, Химки, Россия

² Федеральное медико-биологическое агентство, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад-6, Россия

В ходе оценки эффективности препарата Мefлохин в отношении коронавируса SARS-Cov-2 в экспериментах *in vitro* исследована его токсичность для культуры клеток почки африканской зеленой мартышки — Vero C1008, а также противовирусная активность в отношении SARS-Cov-2, которую оценивали по подавлению цитопатического действия вируса. Изучение токсичности препарата Мefлохин показало, что концентрация, в которой препарат проявляет цитопатическое действие в отношении 50 % клеток Vero C1008 (ЦПД50), составляет 4,5 мкг/мл. Максимальная переносимая концентрация (МПК) Мefлохина составляет 2,25 мкг/мл. Изучение эффективности показало, что через 1 сут после инфицирования противовирусное действие Мefлохина регистрировали при внесении препарата за 24 ч и 1 ч до заражения SARS-CoV-2, а также при его добавлении через 1 ч после инфицирования культуры клеток уже в концентрации 0,5 мкг/мл. Мefлохин в концентрации 2 мкг/мл, добавленный к культуре клеток Vero C1008 через 1 ч после внесения SARS-CoV-2, полностью блокировал действие вируса в течение 2-х сут после инфицирования.

Ключевые слова: коронавирус, SARS-CoV-2, COVID-19, SARS-COV-2, Мefлохин, противовирусная активность

Статья получена: 25.06.2020 **Статья принята к печати:** 17.07.2020 **Опубликована онлайн:** 09.08.2020

DOI: 10.47183/mes.2020.006

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE ACTIVITY OF THE PRODUCT MEFLOCHINE AGAINST CORONAVIRUS SARS-COV-2

Filin KN¹, Berzin IA², Bykov VN¹, Gladkikh VD¹, Loginova SYa³, Savenko SV³, Schukina VN³

¹ Federal State Unitary Enterprise Research & Production Center "Pharmaceutical Protection" of Federal Medical Biological Agency, Khimki, Russia

² Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

³ Federal State Budgetary Institution "48 Central Research Institute" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia

When evaluating the effectiveness of the drug Mefloquine against SARS-CoV-2 coronavirus, *in vitro* experiments examined its toxicity for African green monkey kidney cell culture — Vero C1008, as well as antiviral activity against SARS-CoV-2, which was evaluated by suppressing the cytopathic effect the virus. A study of the toxicity of the drug Mefloquine showed that the concentration at which the drug exerts a cytopathic effect against 50% of Vero C1008 cells is 4.5 µg / ml. The maximum tolerated concentration (MTD) of Mefloquine is 2.25 µg / ml. A study of the effectiveness showed that 1 day after infection, the antiviral effect of Mefloquine was recorded when the drug was added 24 hours and 1 hour before infection with SARS-CoV-2, as well as when it was added 1 hour after infection, the cell culture was already at a concentration of 0.5 µg / ml Mefloquine at a concentration of 2 µg / ml, added to the Vero C1008 cell culture 1 hour after the introduction of SARS-CoV-2, completely blocked the action of the virus for 2 days after infection.

Keywords: coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, SARS-COV-2, Mefloquine, antiviral activity

Received: 25.06.2020 **Accepted:** 17.07.2020 **Published online:** 09.08.2020

DOI: 10.47183/mes.2020.006

Введение

Коронавирусы (Coronaviridae) относятся к семейству РНК-содержащих вирусов, способных инфицировать человека и некоторых животных. У людей коронавирусы могут вызвать целый ряд заболеваний — от легких форм острой респираторной инфекции до тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС). В настоящее время известно о циркуляции среди населения четырех коронавирусов (HCoV-229E, -OC43, -NL63 и -HKU1), круглогодично присутствующих в структуре острых респираторных вирусных инфекций, и, как правило, вызывающих поражение верхних дыхательных путей (ВДП) легкой и средней тяжести [1].

До 2002 года коронавирусы рассматривались в качестве патогенов, вызывающих заболевания ВДП с крайне редкими летальными исходами. В конце 2002 года был зарегистрирован коронавирус SARS-CoV — возбудитель атипичной пневмонии, вызывающий ТОРС. Всего за период эпидемии в 37 странах мира зарегистрировано более 8000 случаев, из них 774 со смертельным исходом. С 2004 года

новых случаев атипичной пневмонии, вызванной SARS-CoV, не регистрировалось [2].

В 2012 году мир столкнулся с новым коронавирусом MERS (MERS-CoV) — возбудителем ближневосточного респираторного синдрома. С 2012 года зарегистрировано 2494 случая этой коронавирусной инфекции, из которых 858 закончились летальным исходом. Все случаи заболевания географически ассоциированы с Аравийским полуостровом. В настоящий момент MERS-CoV продолжает циркулировать и вызывать новые случаи заболевания [3,4].

В декабре 2019 года в г. Ухань, провинция Хубэй выявлено заболевание (получившее название COVID-19), вызываемое новым коронавирусом SARS-CoV-2, поставившее перед специалистами в области здравоохранения новые задачи, связанные с необходимостью быстрой диагностики и разработкой тактики клинического ведения больных [5]. В настоящее время сведения об эпидемиологии, клинических особенностях, профилактике и лечении COVID-19 ограничены и противоречивы. Вирус отнесен ко II группе патогенности, как и некоторые другие представители этого

семейства (вирус SARS-CoV-1, MERS-CoV). Наиболее распространенным клиническим проявлением нового варианта коронавирусной инфекции является пневмония, у значительного числа пациентов зарегистрировано развитие острого респираторного дистресс-синдрома.

К препаратам, отобраным для применения при заражении 2019-nCoV, относятся производные хинолина — хлорохин и гидроксихлорохин [6]. Ранее была продемонстрирована противовирусная активность хлорохина и гидроксихлорохина в отношении SARS-CoV в исследованиях на культуре клеток [7], при этом активность хлорохина была примерно в пять раз выше, чем активность гидроксихлорохина (EC_{50} в культуре клеток составила $6,5 \pm 3,2$ мкМ и 34 ± 5 мкМ, а индекс селективности — >15 и >3 , соответственно). Еще большая противовирусная активность хлорохина установлена в отношении штамма HCoV-OC43 (возбудитель атипичной пневмонии). EC_{50} хлорохина по подавлению репликации вируса в культуре клеток составила $0,306 \pm 0,091$ мкМ.

В экспериментах на мышах установлено, что хлорохин в дозе 15 мг/кг (около 80 мг в пересчете на человека) обеспечивал выживаемость мышей при заражении HCoV-OC43 в дозе 103 копий [8]. Также была отмечен эффект хлорохина, связанный с блокадой репликации вируса MERS в концентрациях 3–8 мкМ [9].

В сравнительном исследовании противовирусной активности хлорохина и гидроксихлорохина *in vitro* [10] были построены кривые «доза-эффект» при четырех различных кратностях заражения (multiplicities of infection — MOI) путем количественного определения количества копий вирусной РНК в супернатанте клеток через 48 ч после заражения. Препараты были внесены в культуру клеток профилактически за 1 ч до заражения вирусом.

В зависимости от дозы заражения, EC_{50} для гидроксихлорохина составила 4,51–12,96 мкМ. Цитотоксическая доза гидроксихлорохина относительно клеточной культуры более чем в 100 раз превышала среднеэффективную дозу в отношении вируса.

В другом исследовании [11] при использовании MOI = 0,01 и лечебном применении гидроксихлорохина (внесение препаратов в среду переживания проводили через 2 ч после инкубации культуры клеток с вирусными частицами при 37 °C) EC_{50} через 24 ч составило 6,14 мкМ (2060 мкг/мл), а через 48 ч — 0,72 мкМ (258 мкг/мл).

Эти препараты, наряду с другими лекарственными средствами, вошли в 5-е и 6-е издания Руководства по профилактике, диагностике и лечению COVID-19, изданные в Китае в январе-феврале 2020 г. Гидроксихлорохин был включен во «Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции «COVID-19» (версии 4–6), изданные Министерством здравоохранения Российской Федерации в 2020 г.

К числу других противомаларийных препаратов, которые потенциально могут применяться при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, относится Мефлохин. Препарат был разработан для лечения форм малярии, устойчивых к хлорохину и гидроксихлорохину.

Исследования, посвященные противовирусной активности Мефлохина, ограничены. Тем не менее, у него была выявлена противовирусная активность в отношении вируса лихорадки Эбола [12], вирусов Денге и Зика [13]. Активность Мефлохина в отношении различных коронавирусов была выявлена в исследованиях *in vitro*.

В сравнительных исследованиях, проведенных на модели заражения культуры клеток вирусом FCoV (кошачий коронавирус), было отмечено, что среди 19-ти различных исследованных соединений к числу наиболее активных относятся хлорохин и Мефлохин. Противовирусная активность Мефлохина в 2–5 раз превышает активность хлорохина, а его среднеэффективная доза, подавляющая цитопатический эффект вируса в культуре клеток, составила 7,5–8,31 мкМ. Среднеэффективная доза по эффекту подавления репликации вируса составила 4,43–7,36 мкМ [14]. Противовирусная активность Мефлохина усиливается при его комбинированном применении с интерфероном [15].

Была выявлена противовирусная активность Мефлохина и в отношении коронавируса 2019-nCoV. Установлено, что Мефлохин блокирует цитопатический эффект коронавируса в культуре клеток и препятствует его репликации в концентрациях не более 10 мкМ (4 мкг/л) [16], однако более точного определения среднеэффективной дозы Мефлохина не проводилось.

Материалы и методы исследований

При выполнении исследования использовались образцы трех серий субстанции Мефлохин (№ 010719, № 020719, № 030719), разработанных в ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России. В работе использовали вирус SARS-nCoV, вариант В, полученный в 2020 году из ФГБУ ГНЦ ВБ «Вектор» (Роспотребнадзор) без данных о выделении, который хранится в Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. В экспериментах использовали постоянную культуру клеток почки африканской зеленой мартышки — Vero C1008. В качестве ростовой и поддерживающей культур использовали среду Игла (MEM) на солевом растворе Хенкса, содержащую соответственно 7,5 % и 2 % фетальной телячьей сыворотки.

Оценку биологических свойств возбудителя SARS-CoV-2 оценивали титрованием вирусосодержащей суспензии в культуре клеток Vero C1008 по цитопатическому действию вируса.

Цитотоксичность образцов препарата Мефлохин оценивали методом визуального наблюдения за состоянием культуры клеток Vero C1008 с помощью светового микроскопа при малом увеличении. Концентрации препаратов, оказывающие цитопатическое действие на клетки (деструкция монослоя клеток и их разрушение по данным визуального наблюдения), рассматривали как токсические. При этом определяли: максимально переносимую концентрацию образцов (МПК) — концентрацию вещества, не вызывающую деструкцию используемой культуры клеток. Оптимальный срок контакта изучаемого соединения с культурой клеток при определении МПК соответствовал периоду максимального функционирования клеточных культур (в среднем 4 суток) [17–19].

Оценку противовирусной эффективности экспериментальных субстанций осуществляли в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России. Противовирусная эффективность Мефлохина оценивалась при внесении его десятикратной концентрации, вызывающей 50 % цитопатический эффект (10 ЦПД50) до инфицирования (за 1 час и 24 часа) и через 1 час после инфицирования. Оценивали влияние на цитопатогенность вируса через 24 часа и 48 часов после инфицирования. Полную

деструкцию монослоя отмечали через 48 часов, через 24 часа — разрушение клеток наблюдали в 75 % случаях. Для каждой исследуемой концентрации препарата Мефлохин использовали по 4 пробирки с монослоем клеток, в трех независимых опытах (сумма пробирок — 12). Критерием оценки эффективности препаратов являлся коэффициент ингибирования (КИ, %) цитопатогенного действия вируса, рассчитываемый по формуле:

$$\text{КИ} = \frac{A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}}{A_{\text{контр}}} \cdot 100\%$$

где $A_{\text{контр}}$ — биологическая активность вируса, определенная в клетках без внесения химиопрепарата, (ЦПД); $A_{\text{оп}}$ — биологическая активность вируса, определенная в клетках с внесением химиопрепарата, (ЦПД).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Приготовление инфицирующих препаратов

Для приготовления инфицирующего препарата вируса SARS-CoV-2, вариант В, использовали культуру клеток Vero C1008. Суспензию клеток с плотностью 200 тыс./мл вносили в стерильные пластиковые флаконы для культуры клеток, инкубировали в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5 % CO₂ при (37,0 ± 0,5) °С до формирования сплошного монослоя (контроль под малым увеличением светового микроскопа). Культуру вируса разводили на ростовой среде. Множественность инфицирования составила 1 БОЕ на клетку. Адсорбцию вируса проводили в течение 60 мин при (37,0 ± 0,5) °С. По окончании адсорбции инокулят удаляли, клетки промывали тремя объемами среды MEM и в каждый флакон вносили 7–8 мл свежей ростовой среды, содержащей 2 % фетальной сыворотки КРС. Флаконы с инфицированным монослоем культуры клеток помещали в CO₂-инкубатор в атмосфере 5 % CO₂ с температурой (37,0 ± 0,5) °С. По истечении времени инкубации (48 часов) проводили криодеструкцию клеток, осветляли и фасовали для хранения при – 70 °С. Оценивали стерильность полученного инфицирующего препарата и его инфекционную активность. Активность рабочей культуры вируса SARS-CoV-2, вариант В, определяли методом негативных колоний на суточном монослое

культуры клеток Vero C1008 (БОЕ/мл) и цитопатическому действию вируса (ЦПД₅₀/мл). Наличие посторонней микрофлоры в приготовленных препаратах оценивали посевом 10-кратного разведения на универсальную селективную триглицероловую среду.

Исследование цитотоксичности препарата Мефлохин для культуры клеток Vero C1008 и его противовирусной активности в отношении вируса SARS-CoV-2.

Исследуемые серии препарата Мефлохина вносили в пробирки с монослоем клеток Vero C1008 и, после инкубирования при температуре (37,0 ± 0,5) °С в течение 120 ч, оценивали их повреждающее действие на клетки.

Результаты экспериментов свидетельствуют, что все изученные серии препарата выявили одинаковую цитотоксичность *in vitro*. Показатель ЦПД₅₀ для используемой культуры клеток составил 4,5 мкг/мл. При этом в концентрациях ниже 2,25 мкг/мл препарат не обладал токсическим действием в отношении культуры клеток, а концентрации, в которых отмечено цитопатическое действие в отношении практически всех клеток монослоя, превышало 8,0 мкг/мл. Таким образом, максимальная переносимая концентрация (МПК) Мефлохина составила 2,25 мкг/мл, а диапазон концентраций препарата для оценки противовирусной активности составил 0,5–2,0 мкг/мл.

Результаты изучения влияния Мефлохина на цитопатическую активность вируса SARS-CoV-2, вариант В, через 24 ч после инфицирования представлены в таблице 1. Результаты были аналогичны для всех изученных серий препарата.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что через 24 часа после инфицирования клеток цитопатический эффект вируса отсутствовал при внесении препарата Мефлохин как до инфицирования, так и после заражения клеток в диапазоне концентраций 0,5–2,0 мкг/мл. В контрольной группе цитопатический эффект составил 75 %.

Результаты изучения влияния Мефлохина на цитопатическую активность вируса SARS-CoV-2, вариант В, через 48 ч после инфицирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Оценка противовирусной активности препарата Мефлохин в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008, через 48 часов после инфицирования (доза инфицирования 10 ЦПД, $n = 9$).

Через 48 часов после инфицирования клеток цитопатический эффект вируса отсутствовал при внесении препарата Мефлохин после заражения клеток

Таблица 1. Оценка противовирусной активности препарата Мефлохин в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008, через 24 часа после инфицирования (доза инфицирования 10 ЦПД, $n = 9$)

Препарат	Концентрация препарата мкг/мл	Частота выявления ЦПД	Коэффициент ингибирования ЦПД, %
За 24 час до инфицирования	2	0/12	> 75
	1	0/12	> 75
	0,5	0/12	> 75
За 1 час до инфицирования	2	0/12	> 75
	1	0/12	> 75
	0,5	0/12	> 75
Через 1 час после инфицирования	4	0/12	> 75
	2	0/12	> 75
	1	0/12	> 75
Через 1 час после инфицирования	0,5	0/12	> 75
	–	9/12	–
Контроль инфицирующей дозы	–	9/12	–
Контроль среды	–	0/12	–

в концентрации 2,0 мкг/мл. В контрольной группе цитопатический эффект составил 100 % (12/12). При внесении препарата за 1 час до инфицирования подавление цитопатической активности вируса не выявлено во всех изученных концентрациях. При внесении препарата за 24 часа до инфицирования 50 % подавление ЦПД отмечено в концентрации 1 мкг/мл, 25 % подавление — в концентрации 0,5 мкг/мл.

Результаты оценки влияния препарата Мефлохин на репродукцию вируса в культуре клеток представлены в таблице 3. В качестве препаратов сравнения были использованы препарат Рибавирин и Ребиф® (Интерферон β1α).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Мефлохин в концентрации 2,0 мкг/мл при внесении его после инфицирования клеток подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 на 1,7–1,9 lg, коэффициент ингибирования составил около 99 %.

Заключение

Полученные результаты позволили доказать, что Мефлохин в концентрации 2 мкг/мл, добавленный к культуре клеток Vero C1008 через 1 ч после внесения SARS-CoV-2, полностью блокировал действие вируса в течение 2-х суток после инфицирования. Через 1 сутки после инфицирования противовирусное действие Мефлохина регистрировали как при внесении препарата за 24 ч и 1 ч до заражения SARS-CoV-2, так и при его добавлении через 1 ч после инфицирования культуры клеток. При этом 100 % подавление вирусной активности отмечали уже при добавлении Мефлохина в концентрации 0,5 мкг/мл. Изучение токсичности Мефлохина показало, что концентрация, в которой препарат проявляет

цитопатическое действие в отношении 50 % клеток Vero C1008 (ЦПД50), составляет 4,5 мкг/мл. Максимальная переносимая концентрация (МПК) Мефлохина составляет 2,25 мкг/мл.

Таким образом, химиотерапевтический индекс (показатель широты терапевтического действия, представляющий собой отношение его минимальной эффективной дозы к максимальной переносимой) для Мефлохина составил ≥ 2 , что свидетельствует о низкой специфической активности препарата. Вместе с тем, следует отметить, что концентрация, в которой отмечается противовирусное действие Мефлохина в отношении SARS-CoV-2, может быть достигнута при приеме препарата в дозах, рекомендованных для профилактики и лечения малярии.

Обобщенные данные фармакокинетических исследований свидетельствуют о том, что при эскалации дозы Мефлохина в диапазоне 250-500-1000-1500 мг (соответствуют «Инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата Мефлохин») отмечено практически линейное увеличение максимальной концентрации препарата в плазме крови: 0,25-0,43-0,8-1,22 мкг/мл, соответственно, при неизменном значении t_{max} — 19,6 ч [20]. При однократном приеме Мефлохина в дозах 750–1500 мг/сут максимальная концентрация в плазме крови достигает 1510 мкг/л [21], а при курсовом приеме увеличивается в 1,8-2,5 раза [22]. Учитывая, что период полувыведения препарата составляет $15,5 \pm 10,4$ сут, концентрация, обеспечивающая элиминацию вируса, может быть достигнута на 2-е — 3-е сутки приема и поддерживается на протяжении всего срока лечения пациента.

Установлено, что концентрация Мефлохина во внутренних органах и клетках крови более чем в 5 раз превышает концентрацию в плазме крови [23–24], а

Таблица 2. Оценка противовирусной активности препарата Мефлохин в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант B, в культуре клеток Vero C1008, через 48 часов после инфицирования (доза инфицирования 10 ЦПД, $n = 9$)

Препарат	Концентрация препарата мкг/мл	Частота выявления ЦПД	Коэффициент ингибирования ЦПД, %
За 24 час до инфицирования	2	12/12	0
	1	6/12	50
	0,5	9/12	25
За 1 час до инфицирования	2	12/12	0
	1	12/12	0
	0,5	12/12	0
Через 1 час после инфицирования	2	0/12	100
	1	12/12	0
	0,5	12/12	0
Контроль инфицирующей дозы	–	12/12	–
Контроль среды	–	0/12	–

Таблица 3. Оценка противовирусной активности препарата Мефлохин в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант B, в культуре клеток Vero C1008, через 48 часов после инфицирования

Препарат	Доза препарата, мкг/мл	Уровень накопления вируса, lg БОЕ/мл	Снижение уровня накопления вируса, Δ, lg	Коэффициент ингибирования, КИ (%)
Мефлохин, серия 010719	2,0	4,61 ± 0,07	1,83	98,93
Мефлохин, серия 020719	2,0	4,50 ± 0,09	1,94	99,06
Мефлохин, серия 030719	2,0	4,73 ± 0,13	1,71	98,83
Ребиф® Интерферон β1α	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100,00
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100,00
Рибавирин, субстанция	100	4,23 ± 0,03	2,21	99,38
Контроль дозы инфицирования	–	6,44 ± 0,09	–	–

концентрация в тканях головного мозга может превышать концентрацию в плазме крови в 10–30 раз, достигая 20 мкМ

[25]. Это может обеспечить элиминацию вируса из внутренних органов уже в 1-е сутки после начала приема.

Литература

1. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. B. Meyer, M.A. Müller, V.M. Corman, et al. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(4): 552–559.
2. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Ksiazek T.G., Erdman D, Goldsmith C.S., et al. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1947–1958.
3. Novel coronavirus infections in Jordan, April 2012: Epidemiological findings from a retrospective investigation. B. Hijawi, et al. *East Mediterr Health J.* 2013; 19: 12–18.
4. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. A.M. Zaki, et al. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367: 1814–1820.
5. Human coronaviruses and other respiratory viruses: underestimated opportunistic pathogens of the central nervous system? Desforges M, Le Coupanec A, Dubeau P, Bourgoïn A, Lajoie L, Dubé M, Talbot P.J., et al. *Viruses.* 2019 Dec pii: E14. doi: 10.3390/v12010014.
6. Chan KW, Wong VT2, Tang SCW1. COVID-19: An Update on the Epidemiological, Clinical, Preventive and Therapeutic Evidence and Guidelines of Integrative Chinese-Western Medicine for the Management of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Am J Chin Med.* 2020; Mar 13: 1–26.
7. Biot, C., Daher, W., Chavain, N., Fandeur, T., Khalife, J., Dive, D., & De Clercq, E. Design and Synthesis of Hydroxyferroquine Derivatives with Antimalarial and Antiviral Activities. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2006; 49(9): 2845–2849.
8. Biot, C., Daher, W., Chavain, N., Fandeur, T., Khalife, J., Dive, D., & De Clercq, E. Design and Synthesis of Hydroxyferroquine Derivatives with Antimalarial and Antiviral Activities. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2006; 49(9): 2845–2849.
9. De Wilde AH., Jochmans D., Posthuma CC. et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8): 4875–84. doi: 10.1128/AAC.03011–14.
10. Liu J., Cao R., Xu M. et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* 2020; Mar 18: 6:16.
11. Yao X., Ye F., Zhang M. et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis.* 2020; Mar 9: pii: ciaa237.
12. Sun W., He S., Martínez-Romero C. et al. Synergistic drug combination effectively blocks Ebola virus infection. *Antiviral Research.* 2017; Jan 137: 165–172.
13. Balasubramanian, A., Teramoto, T., Kulkarni, A. A., Bhattacharjee, A. K., & Padmanabhan, R. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Research.* 2017; 137: 141–150.
14. McDonagh P., Sheehy PA., Norris JM. et al. Identification and characterisation of small molecule inhibitors of feline coronavirus replication. *Vet Microbiol.* 2014; Dec 5; 174(3-4): 438–447.
15. McDonagh P., Sheehy PA., Fawcett A., Norris JM. Antiviral effect of mefloquine on feline calicivirus in vitro. *Vet Microbiol.* 2015; Apr 17; 176(3-4): 370–7.
16. Fan HH., Wang LQ., Liu WL. et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) related coronavirus model. *Chin Med J (Engl).* 2020 May 5; 133(9): 1051–1056.
17. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.-М., Минздрав РФ, 2005.
18. Методические подходы к поиску антивирусных препаратов, их испытание и оценка. Н.А. Лагуткин, Н.И. Митин, В.А. Старовойтова и др. в кн. *Вирусные ингибиторы и механизм их действия* Под ред. В.П. Ложа, МК. Индулен, В.А. Калныня, Н.А. Канель/ Рига, «Зинатне». 1977: 138–149.
19. Чижов Н.П., Ершов Ф.И., Индулин МК. *Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций.* Рига, 1988.
20. Desjardins RE, Pamplin CL 3rd, von Bredow J. et al. Kinetics of a new antimalarial, mefloquine. *Clin Pharmacol Ther.* 1979 Sep;26(3): 372–9.
21. Karbwang, J., Na-Bangchang, K. Clinical application of mefloquine pharmacokinetics in the treatment of P falciparum malaria. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 1994; 8(6): 491–502.
22. Ferreira MVD, Vieira JLF, Almeida ED. et al. Pharmacokinetics of mefloquine administered with artesunate in patients with uncomplicated falciparum malaria from the Brazilian Amazon basin. *Malar J.* 2018; Jul 16;17(1): 268.
23. Rozman RS, Molek NA, Koby R. The absorption, distribution, and excretion in mice of the antimalarial mefloquine, erythro-2,8-bis(trifluoromethyl)-alpha-(2-piperidyl)-4-quinolinemethanol hydrochloride. *Drug Metab Dispos.* 1978 Nov-Dec; 6(6): 654–8.
24. Tao Y., Xue J., Jiang B. [et al.]. Significance of higher drug concentration in erythrocytes of mice infected with *Schistosoma japonicum* and treated orally with mefloquine at single doses. *Parasitol Res.* 2015 Dec; 114(12): 4521–30.
25. Pham YT, Nosten F, Farinotti R. et al. Cerebral uptake of mefloquine enantiomers in fatal cerebral malaria. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1999 Jan;37(1): 58–61

References

1. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. B. Meyer, M.A. Müller, V.M. Corman, et al. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(4): 552–559.
2. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Ksiazek T.G., Erdman D, Goldsmith C.S., et al. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1947–1958.
3. Novel coronavirus infections in Jordan, April 2012: Epidemiological findings from a retrospective investigation. B. Hijawi, et al. *East Mediterr Health J.* 2013; 19: 12–18.
4. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. A.M. Zaki, et al. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367: 1814–1820.
5. Human coronaviruses and other respiratory viruses: underestimated opportunistic pathogens of the central nervous system? Desforges M, Le Coupanec A, Dubeau P, Bourgoïn A, Lajoie L, Dubé M, Talbot P.J., et al. *Viruses.* 2019 Dec pii: E14. doi: 10.3390/v12010014.
6. Chan KW, Wong VT2, Tang SCW1. COVID-19: An Update on the Epidemiological, Clinical, Preventive and Therapeutic Evidence and Guidelines of Integrative Chinese-Western Medicine for the Management of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Am J Chin Med.* 2020; Mar 13: 1–26.
7. Biot, C., Daher, W., Chavain, N., Fandeur, T., Khalife, J., Dive, D., & De Clercq, E. Design and Synthesis of Hydroxyferroquine Derivatives with Antimalarial and Antiviral Activities. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2006; 49(9): 2845–2849.
8. Biot, C., Daher, W., Chavain, N., Fandeur, T., Khalife, J., Dive, D., & De Clercq, E. Design and Synthesis of Hydroxyferroquine Derivatives with Antimalarial and Antiviral Activities. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2006; 49(9): 2845–2849.

9. De Wilde AH., Jochmans D., Posthuma CC. et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8): 4875-84. doi: 10.1128/AAC.03011-14.
10. Liu J., Cao R., Xu M. et al.. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* 2020; Mar 18: 6:16.
11. Yao X., Ye F., Zhang M. et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis.* 2020; Mar 9: pii: ciaa237.
12. Sun W., He S., Martínez-Romero C. et al. Synergistic drug combination effectively blocks Ebola virus infection. *Antiviral Research.* 2017; Jan 137: 165–172.
13. Balasubramanian, A., Teramoto, T., Kulkarni, A. A., Bhattacharjee, A. K., & Padmanabhan, R. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Research.* 2017; 137: 141–150.
14. McDonagh P., Sheehy PA., Norris JM. et al. Identification and characterisation of small molecule inhibitors of feline coronavirus replication. *Vet Microbiol.* 2014; Dec 5; 174(3-4): 438–447.
15. McDonagh P., Sheehy PA., Fawcett A., Norris JM. Antiviral effect of mefloquine on feline calicivirus in vitro. *Vet Microbiol.* 2015; Apr 17; 176(3-4): 370–7.
16. Fan HH., Wang LQ., Liu WL. et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) related coronavirus model. *Chin Med J (Engl).* 2020 May 5; 133(9): 1051–1056.
17. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances [*Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologičeskijh veshhestv.* M.: Minzdrav RF, 2005. (in Russian).
18. Methodological approaches to the search for antiviral drugs, their testing and evaluation [*Metodicheskie podhody k poisku antivirusnyh preparatov, ih ispytanie i ocenka*]. N.A. Lagutkin, N.I. Mitin, V.A. Starovojtova i dr. v kn. *Viral inhibitors and their mechanism of action [Virusnye ingibitory i mehanizm ih dejstvija]* Pod red. V.P. Lozha, MK. Indulen, V.A. Kalhynja, N.A. Kanel' Riga, «Zinatne». 1977: 138-149. (in Russian).
19. Chizhov N.P., Ershov F.I., Indulin MK. The basics of experimental chemotherapy for viral infections [*Osnovy jeksperimental'noj himioterapii virusnyh infekcij*]. Riga, 1988. (in Russian).
20. Desjardins RE, Pamplin CL 3rd, von Bredow J. et al. Kinetics of a new antimalarial, mefloquine. *Clin Pharmacol Ther.* 1979 Sep;26(3): 372–9.
21. Karbwang, J., Na-Bangchang, K. Clinical application of mefloquine pharmacokinetics in the treatment of P falciparum malaria. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 1994; 8(6): 491–502.
22. Ferreira MVD, Vieira JLF, Almeida ED. et al. Pharmacokinetics of mefloquine administered with artesunate in patients with uncomplicated falciparum malaria from the Brazilian Amazon basin. *Malar J.* 2018; Jul 16;17(1): 268.
23. Rozman RS, Molek NA, Koby R. The absorption, distribution, and excretion in mice of the antimalarial mefloquine, erythro-2,8-bis(trifluoromethyl)-alpha-(2-piperidyl)-4-quinolinemethanol hydrochloride. *Drug Metab Dispos.* 1978 Nov-Dec; 6(6): 654–8.
24. Tao Y., Xue J., Jiang B. [et al.]. Significance of higher drug concentration in erythrocytes of mice infected with *Schistosoma japonicum* and treated orally with mefloquine at single doses. *Parasitol Res.* 2015 Dec; 114(12): 4521–30.
25. Pham YT, Nosten F, Farinotti R. et al. Cerebral uptake of mefloquine enantiomers in fatal cerebral malaria. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1999 Jan;37(1): 58–61