

高通量技术在药剂学中的应用

白雪莲, 高永良*

(军事医学科学院 毒物药物研究所, 北京 100850)

关键词: 高通量技术; 多晶型; 理化性质; 生物药剂学性质; 剂型; 信息学

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)06 - 0487 - 06

Application of high-throughput technologies in pharmaceuticals

BAI Xue-lian, GAO Yong-liang*

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Key words: high-throughput technology; polymorph; physicochemical property; biopharmaceutical property; dosage form; informatics

近十多年来,随着组合化学和高通量筛选技术在药物发现过程中的应用日益深入和广泛,化学家们在短时间内即可合成和筛选出大量先导化合物。但是,这些化合物的性质却差强人意,因为在药物化学中通常会利用在化合物适当的位置上引入亲脂性基团的方法来改善化合物的体外活性,这就使得大量的候选药物更加趋向于高分子量、高脂溶性和低水溶性。Lipinski等^[1]曾提出著名的“五原则”,预测当化合物的相对分子质量大于500, logP大于5,氢键受体(N和O)数大于10或氢键供体(OH和NH)数大于5时很可能出现吸收问题。而在药物开发过程中,约有40%的候选药物是因为理化/生物药剂学性质差而被淘汰^[2]。一直以来,人们寄希望并且过分依赖于制剂学手段来解决这些与吸收有关的问题,改善生物利用度,但是由于缺乏对化合物理化/生物药剂学性质的了解和控制,根据性质合理设计剂型还远不能实现,面对大量的化合物或化合物库,传统的制剂学研究方法和手段根本无法解决这些问题。因此,在高通量药物发现和开发时代,制剂学的研究任务和方法也要相应地发生转变,必须对

化合物的性质以及用于临床前动物试验的制剂进行高通量的筛选和发现。

1 多晶型的筛选和发现

固体药物可以多种固态形式存在,包括多晶型、溶剂(水)化物、盐、共结晶和无定型等,而多晶型是固体药物中非常普遍的存在形式。固体药物在制剂和存放过程中,受温度、压力、相对湿度和粉碎程度等影响可能会导致晶型转变,而这种转变会影响药物的性质和效力,影响生物利用度,通常会导致生物不等效,由此给药物的开发和专利保护等带来了很多问题。事实上,很多制药公司都遇到过药物的多晶型问题,结果却鲜有报道,除非这种多晶现象延缓了药物的开发,影响药物的有效性或受到非专利竞争的威胁。雅培公司(Abbott)开发的HIV蛋白酶抑制剂利托那韦(ritonavir)在上市两年后才发现在制剂过程中,利托那韦沉淀形成一种新的晶型(晶型II),晶型II的溶解性比最初的晶型I差,热力学上更稳定,因而影响制剂的溶出速率和生物利用度,致使这种已经上市的制剂不得不撤出市场^[2-4]。由此可见晶型研究在药物开发过程中的重要性,所以应在药物发现过程中尽早发现和筛选出这些可能存在的晶型及其性质,根据不同的给药途径选择合适的晶型加以开发,尽量预测和避免后期开发可能出现的问题。

收稿日期: 2005-08-24.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 66874665,
E-mail: ylgao868@yahoo.com.cn

目前,国外的一些制药公司,如 TansFom, Symyx和 Avantium等,都相继开发了各自的高通量结晶系统,其中应用较多的是 TansFom 制药公司开发的自动化结晶技术平台^[2-4]。这种高通量结晶技术是以一种组合的方法使药物在不同的结晶条件(包括溶剂组成、过饱和度和结晶方法等)下产生尽可能多的固体形式。实验是在 96孔板(或 384孔板)或可定位试管中同时或连续进行的,每一个板孔或试管都是一次独立的试验。首先,在结晶管中加入固体化合物和不同组合的溶剂和/或添加剂,密封以保证整个过程溶剂组成恒定,短暂的升温使药物溶解(必要时可加入另一种溶剂或施以外力,如超声等),然后通过系统控制降温,加入反溶剂或蒸发溶剂等方法使溶液达到过饱和,光学监测固体的生成。转移结晶管中生成的固体,干燥后利用改进的拉曼光谱和粉末 X射线衍射法进行高通量分析并保存数据,利用信息学工具对实验过程中产生的大量光谱数据进行分类比较,计算每对光谱数据的相似性系数,这样就可以很容易判定整个实验过程中共生成了多少种不同的晶型。大多数的高通量结晶系统还结合了多种分析方法对生成的固体做进一步定性(即所谓的二次分析),包括热力学性质测定和光学显微镜检查等。

在药剂学研究中,通常利用成盐来改进化合物的理化性质,主要是用来增加溶解度以提高生物利用度,也有用来增加化学稳定性或降低溶解度(缓释剂型)的。这种高通量的方法可以利用药剂学上可接受的酸或碱制备出大量不同的盐并确定其固体多样性(盐可以多晶型、水化物或溶剂化物的形式存在),根据其理化性质和剂型要求选择合适的盐型。高通量结晶技术还可以发现和避免潜在的多晶型。此外,药物或候选药物的共结晶可能比溶剂(水)化物更有前景,因为在药剂学上可以接受的溶剂有限,而且溶剂化物在制剂过程中经常会发生去溶剂(水)现象,转变成不稳定的无定型或溶解性更差的晶型。如果有协同作用的固体药物能够以化学计量比形成共结晶,也将成为药物开发中一类很有前景的新型原料。高通量结晶系统可以实现溶剂组合和组分的多样性,虽然这种技术很难控制但是值得期待。

几乎所有的高通量技术都与计算机技术密切相关,包括样品的管理、操作系统的控制、结果的分析 and 处理等,计算机技术促进了高通量的实现。此外,以计算机技术为基础的辅助模拟和计算在晶体结构

和多晶型结构预测方面也发挥着重要的作用,相继出现了一些理论研究方法,大多是以计算晶格能为基础,预测其结构稳定性^[5,6]。Ab initio法已经成功预测了一些非解离的刚性小分子的晶体结构,但对于多组分的复杂体系及其相对的稳定性则难以准确预测。还有 simulated annealing法和能量最小化等计算方法。由于对固体多样性产生的机制和分子性质,尤其是多晶型的成核过程还不是很清楚,这些方法的应用也受到限制,因为不仅是晶格能影响晶体结构,结晶动力学也是一个重要因素,所以这些方法也在不断改进和完善。在此基础上还开发了一些商业软件,如 Polymorph PredictorTM等。此外,利用计算机技术还可以帮助设计高通量结晶的实验条件,模拟出那些在结晶实验中很难得到的亚稳晶型。而高通量结晶实验也可以帮助发现影响结晶的因素,有助于计算机技术进行模拟和筛选。

2 理化/生物药剂学性质的筛选和发现

药物的理化性质和生物药剂学性质是决定药物制剂开发成败的重要因素,很多与药物吸收、分布、代谢和排泄(ADME)相关的性质都可以通过一系列的体内和体外模型进行筛选和评价。根据 Lipinski的“五原则”和生物药剂学分类系统(BCS)^[7],药物溶解性和膜通透性是影响吸收的两个重要因素。水溶性差或脂溶性好的药物很难制成传统的口服制剂,溶出和吸收困难;对静脉注射剂的影响更大,容易形成沉淀继而引发稳定性等问题。目前关于难溶性药物的递送系统(ISDD)备受关注,但是在药物发现阶段,利用制剂学手段来解决这些与溶解和吸收有关的问题,无疑会延长制剂开发时间,增加开发成本。因此,采用高通量实验技术对药物的溶解性和膜通透性进行筛选和测定将对整个研发过程有重要意义。

传统的平衡溶解度法,是将化合物溶于一定的溶剂(水)中,在热力学条件下振摇至少 24 h,直至不再溶解,过滤,采用适当的分析方法测定溶解的化合物浓度,即热力学溶解度。这种方法耗时费力,明显不适合现代的高通量药物发现和开发。近年来开发的几种高通量溶解度测定法大多是先将药物溶于 DMSO溶液中,再用水性介质(或磷酸盐缓冲液)进行一系列的稀释测定浊度溶解度,一方面是因为生物学实验室进行活性筛选用的是化合物的 DMSO溶液(约 10 mmol·L⁻¹),另一方面是这种方法同样可以克服决定化合物热力学溶解度的晶格能,通常被称为动力学溶解度。

Lipinski等^[1,8]最早提出了浊度法(turbidimetry),将化合物溶于DMSO中制成 $10\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (或 $20\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)的贮备液,每隔1min在装有2.5mL pH7磷酸盐缓冲溶液(PBS)的试管中加入DMSO贮备液1 μL (或0.5 μL),直到化合物达到最大溶解度而析出沉淀,由于沉淀发生光散射会使UV吸收增加,通过UV检测器在600~820nm测定溶液浊度(因为大多数药物的紫外吸收在此范围以下)来计算溶解度,共加入14次DMSO溶液,溶解度范围在5~65 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Bevan等^[8,9]在此基础上又提出了另一种相似的激光散射浊度法(nephelometry)。该方法是利用可见光通过混悬液时,有一部分入射光发生散射,根据散射光的强度与分散相的浓度成正比的原理,不但可以测定沉淀析出的转变点还可以测定混悬液进一步稀释成溶液的转变点。在96孔(或384孔)滴定板上,将化合物的DMSO溶液用PBS稀释20倍,再用5%DMSO/PBS进行一系列的稀释,在633nm处测定化合物沉淀形成或消失时的浊度溶解度,96孔板的读板时间(扫描时间)为1min。目前已经有商品化的激光浊度计,如NEPHELOstar高通量微板浊度筛选仪。这种方法虽然固定了DMSO的浓度,不同的化合物之间可以直接比较,结果与HPLC方法也有较好的相关性,但毕竟不是热力学溶解度,而且浊度法的灵敏度相对较低,不能对水溶性低于 $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物进行测定和分类。此外,还有很多类似的溶液沉淀法和固体溶解法等^[10]。Chen等^[11]利用多波长紫外板读数和96孔紫外板可以快速地测定溶解度,该方法灵敏度高,重现性好,可以测至 $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,与HPLC法测得的溶解度相关性较好。首先要制备化合物的饱和溶液,将化合物以粉末或DMSO溶液形式分散至磷酸盐缓冲溶液中,超声,室温条件下涡旋振荡至平衡,再转移至0.22 μm 的96孔过滤板上,利用微孔多头抽真空装置过滤(也可以离心取上清液)至96孔紫外板上,测定230~280nm的6个波长的紫外吸收,多波长读数可以满足不同化合物的准确度要求,而且如果不同波长测得的溶解度明显不同,表明很可能存在杂质。尽管DMSO广泛用于药物发现研究中制备化合物的贮备液和培养试验样品,但是DMSO的存在还是会影响化合物真实的水溶性,尤其对水溶性差的化合物,因此还是希望能够以相对高的通量测定化合物在水中的真实溶解度。多波长紫外读数方法可以作为药物发现和开发过程中首选的溶解度筛选方法。

膜通透性是影响药物吸收的另一个关键因素。药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程中需要穿过多种生物膜屏障,而生物膜实质上是一种两亲性的脂质膜,因而要求药物分子具有一定的亲水亲油平衡值。膜通透性受药物的辛醇-水分配系数($\log P/\log D$)、解离状态(pKa)、氢键和分子大小等理化性质的影响,这些参数都可以用于预测药物在体内的被动吸收。但在药物发现阶段,原料药有限,也不可能花费很多人力和时间来研究这些参数。目前,Caco-2单层细胞^[12]和马达二氏犬肾细胞(MDCK)已经广泛用于评价药物的膜通透性和口服吸收效果,但细胞培养系统对试验条件相当敏感,很难实现高通量。近年来,利用人造膜和表面细胞质基因组共振生物传感器^[13]可以实现高通量的膜通透性评价。Wohnsland等^[14]采用一种类似“三文治”的夹层结构,在加样室和接收室之间夹有9~10 μm 的十六烷液层,测定化合物从加样室扩散到接收室的能力。测定是在96孔滴定板上完成的,由于膜两侧都是水性缓冲溶液,可以提供一个相对较宽的pH范围,所以这种高通量的方法可以产生大量pH膜通透性和辛醇-水分配系数的实验数据^[8,14,15]。

由于自动化的样品制备和处理技术或细胞培养技术,以及高效、快速灵敏的分析手段(LC-MS/MS)的联合应用,很多体外ADME性质都可以在96(或384)孔板上实现高通量的筛选和测定。利用微粒体、肝细胞、重组细胞色素P450(CYP)或其混合酶等可以筛选和预测药物在体内的代谢性质^[16],此外,CYP是药物代谢过程中最重要的酶,临床相关的药物相互作用也可能与特异性CYP的抑制/诱导作用有关。目前已经有一种氧生物传感系统通过测定P450代谢反应过程中的耗氧量可以快速测定药物的相对清除率。Jenkins等^[17]建立的SAGIANTM核心机器人系统的利用也可以同时测定药物的代谢稳定性和CYP抑制作用。

目前,药物在动物体内的代谢和药代动力学(PK)研究主要是通过盒氏给药(cassette dosing或称鸡尾酒给药cocking dosing)法^[18,19]和样品混合(sample pooling)法^[20,21]实现高通量的。盒氏给药法是将多个化合物同时给予一只动物,同时取样和测定多个化合物。而样品混合法则是每只动物给予一种化合物,将相同时间点取的样品混合后同时测定,这种方法可以避免盒氏给药法可能存在的药物相互作用。

此外,利用传统的定量构效关系(QSAR)研究方法,以及分子模拟的计算机技术(in silico),在早期预测ADME性质方面也取得了一定的进展^[22-24]。在大量的数据(库)基础上,构建了定量结构-吸收关系(QSAR),定量结构-药代动力学关系(QSPR),还开发了很多模拟吸收程序,如GastroPlusTM, iDEATM等。近年来也在不断尝试直接用分子结构来预测生物利用度。

3 制剂和剂型的筛选和发现

在药物发现阶段,制剂学研究的任务通常是为用户提供一种简单、安全和稳定的制剂,并对化合物的药剂学性质作出初步预测。液体制剂作为一种简单的递送载体,只要使化合物能有效溶解,很容易实现高通量,尤其是静脉注射剂,可以给出重要的药代动力学参数,如绝对生物利用度等。

辉瑞公司(Pfizer)发现在300多个化合物中有近80%可以通过pH调节和潜溶剂或两种方法的组合使化合物溶解,在此基础上提出一套系统的静脉制剂决策方案(decision tree),为临床前动物试验筛选出可供静脉注射的制剂^[25]。此外,还可以选择其他手段合理设计和筛选静脉注射剂,如环糊精、表面活性剂、混合胶束、脂质乳剂、纳米和微米混悬剂等,最重要的是选择的载体不干扰化合物在体内的代谢行为或药代动力学性质。通常对于可解离的化合物,在生理条件下的pH调节作为首选,其次是潜溶剂和环糊精,如果能保证化合物可定量而快速的溶出,还可以考虑纳米和微米混悬剂。建议尽量不要使用表面活性剂、脂质乳剂和混合胶束,尽管相对于上述方法,可以避免化合物在血液中析出沉淀,但是很可能改变药物在体内的代谢和分布过程^[26]。

TansForm 制药公司还开发了一套制剂技术平台,利用不同组合的增溶剂和稳定剂的混合物来筛选和发现可以静脉和口服递送的稳定的液体制剂,用于早期的动物PK研究,临床试验或最终开发成上市产品。整个过程包括合理的实验设计和自动化的固体处理技术,在96孔板(或384孔板)中产生不同浓度的辅料和辅料组合,密封或加热,在一定的温度条件下振摇一定时间,利用各种分光 and 光学技术分析溶解度和稳定性, SFinXTM口服制剂平台每天可以筛选大约2500个制剂,而FASTTM静脉注射制剂平台每天可以筛选4000~5000个制剂^[2]。

利用这种高通量技术还可以改善药物剂型设计的速度和效率。市售紫杉醇静脉注射剂(taxol)是将其溶于乙醇和聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL, Cr

EL) 1:1的混合溶媒中制成 $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓缩液,使用前需要用生理盐水或葡萄糖稀释5~20倍。聚氧乙烯蓖麻油增溶效果虽好,但易引发过敏等诸多不良反应,而且存在稀释稳定性问题。在过去几年,药剂学上一直致力于研究不含CrEL的紫杉醇产品,但紫杉醇水溶性极差,传统的方法,包括潜溶剂、环糊精、脂质体和乳剂等都很难使紫杉醇在稀释24或48h后静脉输注仍维持有效浓度。利用这种高通量组合制剂的方法在保留乙醇的情况下,用其他的增溶剂或添加剂组合替代CrEL。将12种FDA通过的增溶剂或添加剂溶于PBS分别制成3个浓度,得到的36种溶液按完全因子组合,由MatLab程序随机生成9880种可能的组合,分注到板孔中后,再加入事先制备的紫杉醇乙醇贮备液,每种组合中紫杉醇的质量浓度为 $1.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,密封,振荡5min,温育48h,UV板读数在500nm处检测紫杉醇的沉淀,根据命中的组合出现的频率,再进一步进行优化,通过这种方法发现的制剂用生理盐水稀释5~20倍也不会析出沉淀,并且在动物试验中显示较好的耐受性和较低的毒性。这种高通量技术可以在很短的时间筛选很多组合条件,而且通过组合的方法还可以考察辅料间的相互作用,这对制剂的优化很重要^[27]。

此外,透皮给药作为一种新型的系统给药方法,倾注了近40年大量的研究,成果依然寥寥无几,其主要的技术难题在于皮肤的天然屏障使很多化合物尤其是大分子药物难以透过,而且化学促渗剂在达到促渗效果所需的浓度时又难以避免潜在的皮肤刺激性。近年来,不断开发出了一些新型的促渗剂,但仍然很难兼顾高效促渗和低刺激性。Karande等^[28,29]利用高通量技术筛选和发现不同种类的促渗剂组合,为透皮制剂的开发提供很多新的机会,这种组合不同于传统的经验组合,而是具有协同效应的促渗剂组合(SCOPE),选择32个不同种类的促渗剂随机配对,每一对产生44种不同的化学组成,结果得到一个25000个候选的协同促渗剂组合库。采用阵列的形式,以100孔的聚四氟乙烯板作为加样板,对应的聚碳酸酯板作为接收板,中间夹有皮肤,通过测定皮肤的阻抗(如传导率和电流等)来评价皮肤的通透性,这样就很容易实现高通量。与传统的方法(Franz扩散池法)相比,大大减少了皮肤的用量,效率提高了100多倍,每天可以进行500~1000次试验。筛选命中的促渗剂组合再进一步用来筛选刺激性和大分子的递送。

另外,在 96孔板上还可以实现高通量的体外溶出试验,每一列可以代表一个受试药或一种晶型或一种溶出介质,在不同的时间点加样形成混悬液,然后转移至 96孔过滤板上一次过滤,再用 UV或 HPLC定量分析,其中最后 1个加样点即为第 1个取样时间点。这种方法只能用来比较和筛选而不能准确测定,可以用于制剂的处方筛选^[4]。

4 信息学技术

分析能力也是高通量技术的关键部分,需要强大的信息学和统计学工具的支持,包括合理的实验设计,及时在线的数据处理(采集、分析、分类和存储)以及构建预测模型等^[3]。根据浓度构建线性和高级回归模型,可以用来研究制剂中添加剂的协同效应或预测其中药物的浓度。根据性质或化学描述符(计算机语言)构建的模型类似于传统的 QSAR方法,因为涉及到多个性质或多个附加的描述符,所以通常会采用多元非线性回归,最小二乘法和概率神经网络分类等模型,可以同时药物的多个理化、生物药剂学或药剂学性质进行优化,这对于药物的开发具有重要的意义。

5 结论与展望

高通量技术需要在高度的微型化、自动化和一体化的基础上才能实现,并且依赖于信息学工具的支持和帮助。另外,计算机技术(in silico)已经成为继理论研究、实验技术之后的第三种研究手段,辅助筛选和模拟设计在高通量技术中也发挥着重要的作用。

近年来,随着各种先进的高通量合成和筛选技术、生物技术、计算机辅助模拟技术、蛋白质和基因组学的应用和发展,药物发现的速度和数量与日俱增,但是新药开发的能力和产品的数量却有减无增,候选药物的淘汰率和开发时间已经成为药物开发的两大瓶颈。原因很简单,对于一个成功的候选药物,有效性和选择性固然必不可少,但还必须具有合适的药代动力学性质、理化性质以及制剂学性质。药学研究者已经意识到了这一点,并且改变了研究策略和方法,即在药物发现的早期阶段,在活性筛选的同时进行生物药剂学性质筛选,还要进行必要的动物试验,因为化合物在体内的清除率和半衰期等性质很难在分子和细胞水平上进行的体外筛选中得到,而这些信息对于选择和优化先导化合物至关重要。所以,药剂学研究的任务和方法也应作出相应的改变,一方面要能在短时间内为动物试验提供简单、安全和稳定的制剂,另一方面要对化合物的理化

性质和生物药剂学性质作出预测,以避免后期开发遇到问题而延长开发时间。高通量技术在药剂学中的应用无疑将成为现代高通量药物发现和开发必不可少的一部分,也为药剂学研究提供了一种新的思路和方法,有助于实现高通量制剂筛选和合理设计剂型。尽管目前国内这方面的工作开展得很少,但应用前景广阔而且很有意义。

References

- [1] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23: 3 - 25; *PII*, 2001, 46: 3 - 26.
- [2] Gardner CR, Walsh CT, Almarsson O. Drug as materials: valuing physical form in drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 926 - 934.
- [3] Gardner CR, Almarsson O, Chen HM, et al. Application of high throughput technologies to drug substance and drug development [J]. *Comp Chem Eng*, 2004, 28: 943 - 953.
- [4] Morissette SL, Almarsson O, Peterson ML, et al. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 275 - 300.
- [5] Vippagunta SR, Brittain HG, Grant David JW. Crystalline solids [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 48: 3 - 26.
- [6] Datta S, Grant David JW. Crystal structure of drugs: advances in determination, prediction and engineering [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 42 - 56.
- [7] Amidon GL, Lennefors H, Shah VP. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability [J]. *Pharm Res*, 1995, 12: 413 - 420.
- [8] Kems EH. High throughput physicochemical profiling for drug discovery [J]. *J Pharm Sci*, 2001, 90: 1838 - 1858.
- [9] Bevan CD, Lloyd RS. A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates [J]. *Anal Chem*, 2000, 72: 1781 - 1787.
- [10] Sugaya Y, Yoshida T, Kajima T, et al. Development of solubility screening methods in drug discovery [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2002, 122: 237 - 246.
- [11] Chen TM, Shen H, Zhu C. Evaluation of a method for high throughput solubility determination using a multi-wavelength UV plate reader [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2002, 5: 575 - 581.
- [12] Krishna G, Chen KJ, Lin CC, et al. Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using *in vitro* human absorption model, Caco-2 [J]. *Int J Pharm*, 2001, 222: 77 - 89.

- [13] Tong XS, Wang J, Zheng S, et al. High-throughput pharmacokinetics screen of VLA-4 antagonists by LC/MS/MS coupled with automated solid-phase extraction sample preparation [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 35: 867 - 877.
- [14] Wohnsland F, Faller B. High-throughput permeability pH profiles and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes [J]. J Med Chem, 2001, 44: 923 - 930.
- [15] Hitzel L, Watt AP, Locker KL. An increased throughput method for determination of partition coefficients [J]. Pharm Res, 2000, 17: 1389 - 1395.
- [16] Bertrand M, Jackson P, Walther B. Rapid assessment of drug metabolism in the drug discovery process [J]. Eur J Pharm Sci, 2000(Suppl 2): S61 - S72.
- [17] Jenkins KM, Angeles R, Quintos MT, et al. Automated high throughput ADME assays for metabolic stability and cytochrome P450 inhibition profiling of combinatorial libraries [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 34: 989 - 1004.
- [18] Frick LW, Adkison KK, Wells-Knecht KJ, et al. Cassette dosing: Rapid *in vivo* assessment of pharmacokinetics [J]. Pharm Sci Technol Today, 1998, 1: 12 - 18.
- [19] Bayliss MK, Frick LW. High-throughput pharmacokinetics: cassette dosing [J]. Curr Opin Drug Discov Dev, 1999, 2: 20 - 25.
- [20] Singh RP, Singh SK, Gupta RC. A high throughput approach for simultaneous estimation of multiple synthetic trioxane derivatives using sample pooling for pharmacokinetic studies [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 37: 127 - 133.
- [21] Cox KA, White RE, Korfmacher WA. Rapid determination of pharmacokinetic properties of new chemical entities: *In vivo* approaches [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2002, 5: 29 - 37.
- [22] van de Waterbeemd H. High-throughput and *in silico* techniques in drug metabolism and pharmacokinetics [J]. Curr Opin Drug Discov Dev, 2002, 5: 33 - 43.
- [23] Ekins S, Waller CL, Swaan PW, et al. Progress in predicting human ADME parameters *in silico* [J]. J Pharmcol Toxicol Methods, 2000, 44: 251 - 272.
- [24] Norris DA, Leesman GD, Sinko PJ, et al. Development of predictive pharmacokinetic simulation models for drug discovery [J]. J Control Release, 2000, 65: 55 - 62.
- [25] Lee YC, Zocharski PD, Samas B. An intravenous formulation decision tree for discovery compound formulation development [J]. Int J Pharm, 2003, 253: 111 - 119.
- [26] Bittner B, Mountfield R. Intravenous administration of poorly soluble new drug entities in early drug discovery: the potential impact of formulation on pharmacokinetic parameters [J]. Curr Opin Drug Discov Dev, 2002, 5: 59 - 71.
- [27] Chen HM, Zhang Z, McNulty C, et al. A high-throughput combinatorial approach for discovery of a Cremophor EL-free Paclitaxel formulation [J]. Pharm Res, 2003, 20: 1302 - 1308.
- [28] Karande P, Jain A, Mitragotri S. Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22: 192 - 197.
- [29] Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3: 115 - 124.