

## In-Vitro 흡수특성 검색모델로서 Caco-2 및 MDCK 세포배양계의 특성 비교 평가

고운정 · 천은파 · 한효경<sup>†</sup>

조선대학교 약학대학

(2008년 5월 20일 접수 · 2008년 6월 10일 승인)

## Comparison of Caco-2 and MDCK Cells As an In-Vitro ADME Screening Model

Woon-Jung Go, Eun-pa Cheon and Hyo-Kyung Han<sup>†</sup>

BK21 Project team, College of Pharmacy, Chosun University, Seosuk-dong, Gwangju, Korea

(Received May 20, 2008 · Accepted June 10, 2008)

**ABSTRACT** – The present study compared the feasibility of Caco-2 and MDCK cells as an efficient in-vitro model for the drug classification based on Biopharmaceutics Classification System (BCS) as well as an in-vitro model for drug interactions mediated by P-gp inhibition or P-gp induction. Thirteen model drugs were selected to cover BCS Class I~IV and their membrane permeability values were evaluated in both Caco-2 and MDCK cells. P-gp inhibition studies were conducted by using vinblastine and verapamil in MDCK cells. P-gp induction studies were also performed in MDCK cells using rifampin and the P-gp expression level was determined by western blot analysis. Compared to Caco-2 cells, MDCK cells required shorter period of time to culture cells before running the transport study. Both Caco-2 and MDCK cells exhibited the same rank order relationship between in-vitro permeability values and human permeability values of all tested model compounds, implying that those in-vitro models may be useful in the prediction of human permeability (rank order) of new chemical entities at the early drug discovery stage. However, in the case of BCS drug classification, Caco-2 cells appeared to be more suitable than MDCK cells. P-gp induction by rifampin was negligible in MDCK-cells while MDCK cells appeared to be feasible for P-gp inhibition studies. Taken all together, the present study suggests that Caco-2 cells might be more applicable to the BCS drug classification than MDCK-cells, although MDCK cells may provide some advantage in terms of capacity and speed in early ADME screening process.

**Key words** – Caco-2 cell, MDCK cell, In-vitro model, Permeability, BCS

최근 들어 genomics, bioinformatics, combinatorial chemistry의 발전으로 짧은 시간 내에 수많은 신약후보물질들이 얻어지고 있어 검색 대상이 되는 물질의 수는 기하급수적으로 늘어나고 있다. 따라서, 현재 Caco-2, MDCK, HeLa, HEK 또는 각종 transfected cell line 등을 이용한 여러 가지 in-vitro 검색기법들이 개발되어 신약 후보 물질들의 초기 검색 단계에서 사용되고는 있으나, 아직도 여러 면에서 (정확도, 재현성, 효율성, 신속성 등) 개선되어야 될 점들이 많아 그 기능을 충분히 발휘하지 못하고 있는 형편이다. 이에, 선진국의 경우 보다 효율적인 in-vitro 체내동태 고속 평가 방법의 개발 및 실용화에 중장기적인 투자가 지속적으로 이루어지고 있는 추세이다. 이러한 국제적 동향과 변화에 대한 깊은 이해와 더불어, 신약 개발의 새로운 패러다임으로의 신

속한 전환을 위해, 단시간 내에 많은 약물들의 체내동태를 효율적으로 검색할 수 있는 in vitro 체내동태 평가 기술의 확보가 국내 제약 산업의 국제경쟁력 강화를 위해 필수적이라 할 수 있다. 그 중 Caco-2 cell을 통한 약물의 세포막 투과도는 사람의 소장점막 투과도와 좋은 상관관계를 보여 주고 있어, Caco-2 cell은 약물의 장관막 투과성을 예측하는 in-vitro 실험계로서 많이 사용되고 있다.<sup>1)</sup> 또한 MDCK cell도 Caco-2 cell과 epithelial cell의 여러가지 특징들을 공통적으로 나타내고 있는 것으로 보고되어 왔다. 특히, MDCK cell과 Caco-2 cell에 있어서 수동적으로 흡수되는 약물 투과도 간에 좋은 상관 관계가 있다는 것은, Caco-2 cell과 더불어 MDCK cell 또한 소장 흡수도 모델로서 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시한다.<sup>2)</sup> 또한 Caco-2 cell 단층막 투과도 값은 약물을 투과도와 용해도에 따라 4가지 그룹으로 나누는 BCS<sup>3)</sup>(Biopharmaceutics Classification System)에도 이용할 수 있다. US FDA의 가이드라인에 따르면, BCS에서는 각각의 약물을 용해도와 장관막 투과도의 특성

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 062)230-6364, E-mail : hkhan@chosun.ac.kr

에 따라 다음과 같이 4가지 계열로 분류하게 된다. Class I은 High Solubility와 High Permeability, Class II는 Low Solubility와 High Permeability, Class III는 High Solubility와 Low Permeability, Class IV는 Low Solubility와 Low Permeability의 특성을 가진 약물들로 나누어 진다. 따라서, BCS에 따른 약물 분류를 위해서는 약물의 용해도와 인체 내에서의 세포막 투과 계수를 필요로 하게 됨으로, 소량의 약물로 인체 내에서의 약물투과 정도를 신속하게 예측해 낼 수 있는 in-vitro 평가 방법의 개발은 BCS의 활용도를 증가시키는데 있어 매우 중요한 부분을 차지한다고 할 수 있다. 이와 더불어 최근 많은 약물들이 이들의 흡수를 촉진하거나 제한하는 장내 세포막 수송체들의 기질임이 보고 되었다. 그 중 경구 약물의 수송을 제한하는 주요한 장벽 중 하나는 P-glycoprotein (P-gp)에 의한 장내 소장점막으로부터의 약물의 능동적 유출이다. P-gp는 1976년에 암세포에서 처음 발견되었고 이것은 약물내성현상과 관계가 있는 것으로 밝혀졌다.<sup>4)</sup> 최근에는, P-gp가 사람의 소장, 간, 췌장, 뇌, 신장과 같은 정상적인 조직에도 널리 분포되어있다는 것이 보고되었다.<sup>5)</sup> P-gp는 위장관 상피세포와 같이 polarized cell membrane의 apical side에 발현되어 있는데 이러한 P-gp의 polarized expression은 분비, 해독화 시스템으로써의 기능을 하며, 또한 P-gp는 소장점막을 통한 약물의 투과를 방해하는 주요한 장벽으로도 대표될 수 있다.<sup>2)</sup> 그러므로, 약물의 경구 투여 시 약물과 P-gp간의 상호작용에 대한 이해는 약물의 체내동태 특성을 예측하는데 있어 매우 중요한 역할을 담당한다. 이와 같은 연구 배경에 기초하여 본 연구에서는 세포 배양 시 시간에 따른 P-gp의 발현 변화를 측정하고 P-gp inhibition/induction study를 통하여 미량의 물질을 가지 고도 P-gp에 의한 약물상호작용 가능성을 신속하게 예측할 수 있는 in-vitro 고속 평가 방법으로서의 MDCK cell의 효용성을 평가하였다. 또한 Caco-2 나 MDCK cell 같은 세포 단층막을 이용한 in-vitro 세포막투과계수가 약물의 BCS<sup>6)</sup> 분류에 얼마나 유용하게 사용될 수 있는지를 비교 평가함으로써 약물의 약동학적 특성평가를 위해 수행되고 있는 여러 관련 연구들에도 유용한 정보를 제공하고자 한다.

## 실험 방법

### 시약 및 재료

Caco-2 cell과 MDCK cell은 한국세포주은행으로부터 구입하였으며, antipyrine, caffeine, phenylalanine, metoprolol, theophylline, piroxicam, naproxen, atenolol, ranitidine, fexofenadine, tetracycline, furosemide, ofloxacin은 Sigma

Chemical Co.(St Louis, MO, US)의 것을 구입하였다. 모든 화학물질과 용매들은 HPLC급 시약들을 사용하였다. Anti-βactin 항체는 Sigma (Saint Louis, MO, US)에서 구입하였고, anti P-gp mouse 항체는 Calbiochem (Darmstadt, Germany), alkaline phosphatase anti Mouse Ig G는 Jackson Immuno Research (West Grove, PA)에서 구입하였다. HPLC정량을 위하여 pump (LC-10AD), automatic injector (SIL-10A), UV detector (SPD-10A)로 구성된 chromatographic system (Shimadzu Scientific Instruments, Tokyo, Japan)을 사용하였다. Octadecylsilane column으로써 Gemini C18(4.6×250 mm, 5 μm, Phenomenex, Torrance, CA)를 사용하였다.

### 세포 배양

Caco-2 cell과 MDCK cell은 10% FBS, 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 1% L-glutamine과 penicillin(100 U/mL)/streptomycin(100 mg/mL)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)를 이용하여 배양하였다. 모든 세포는 5% CO<sub>2</sub>, 90% 상대습도, 37°C 온도에서 CO<sub>2</sub> Incubator MCO-175(Sanyo, Moriguchi City, Japan)에서 배양하였다.

### 세포단층막을 이용한 세포막 투과계수 측정

BCS Class I~IV를 모두 포함할 수 있도록 다음과 같이 13종의 모델약물들을 선정하였다.<sup>2)</sup>

Class I: Antipyrine, Caffeine, Phenylalanine, metoprolol, Theophylline

Class II: Piroxicam, Naproxen

Class III: Atenolol, Ranitidine, Fexofenadine, Tetracycline

Class IV: Furosemide, Ofloxacin

시험할 약물을 pH 6.5 완충액(난용성일 경우 0.2% 이하의 ethanol 또는 DMSO 첨가)에 녹인 다음, paracellular marker 인 <sup>3</sup>H-mannitol (0.1 uCi/mL)을 첨가하여 약물용액을 조제하였다. Transwell (24 mm Diameter Inserts, 0.4 μm Pore Size, Corning Inc., NY, USA)을 사용하여 세포를 배양한 후, 각각의 well로부터 세포배양액을 제거한 후, pH 6.5 완충액으로 세포를 2번 씻어주었다. 각각의 well에 약물용액(1.5 mL)을 donor side (apical side)에, 그리고 pH 7.4 완충액(2.5 mL)을 receiver side (basolateral side)에 넣어 준 다음, plate shaker상에서 반응을 시켰다. 정해진 시간(0, 15, 30, 60, 90, 180 min)에서, 200 uL의 샘플을 receiver side로 부터 취한 다음, 동량(200 uL)의 pH 7.4 완

충액을 receiver side에 보충해 줌으로써, receiver side의 용량이 일정하게 유지 되도록 하였다. Donor side로부터 세 시점(0, 60, 180 min)에서 각각 200 uL씩 샘플을 채취한 후, 각각의 샘플 중의  $^3\text{H}$ -mannitol 농도를 scintillation counter를 이용하여 정량하였다. 각각의 샘플 중의 약물 농도를 HPLC를 이용하여 정량하였다.

### 배양시간에 따른 P-gp의 발현 변화 측정

MDCK cell의 경우 시간에 따른 P-gp 발현 변화에 대한 보고가 없기 때문에, 본 연구에는 MDCK cell에서 P-gp 발현 정도가 배양시간에 따라 어떻게 변화하는지를 측정하였다. MDCK cell을 각각 6-well plate에 seeding한 후, seeding한 날로부터 3, 7, 10, 14, 21일 경과했을 때 각각의 well로부터 배양액을 제거하고 세포층을 ice-cold PBS 완충액으로 3번 씻어주었다. 세포를 터트린 후 얻어진 샘플에 대해 western blot을 이용하여 P-gp의 발현 정도를 측정하였다.

### P-gp inhibition study

Vinblastine을 pH 7.4 완충액(난용성일 경우 0.2% 이하의 ethanol 또는 DMSO 첨가)에 녹인 다음, paracellular marker인  $^3\text{H}$ -mannitol (0.1 uCi/mL)을 첨가하여 약물용액을 조제하였다. Transwell (24 mm Diameter Inserts, 0.4 um Pore Size, Corning Inc., NY, USA)을 사용하여 세포를 배양한 후, 각각의 well로부터 세포배양액을 제거한 후, pH 6.5 완충액으로 세포층을 2번 씻어주었다. 각각의 well에 약물용액(2.5 mL)을 donor side (basolateral side)에, 그

리고 pH 6.5 완충액(1.5 mL)을 receiver side (apical side)에 넣어 준 다음, plate shaker상에서 반응을 시켰다. 정해진 시간(0, 15, 30, 60, 90, 180 min)에서, 100 uL의 샘플을 receiver side 부터 취한 다음, 동량(100 uL)의 pH 6.5 완충액을 receiver side에 보충해 줌으로써, receiver side의 용량이 일정하게 유지 되도록 하였다. Donor side로부터 세 시점(0, 60, 180 min)에서 각각 100 uL 씩 샘플을 채취하고, 각각의 샘플중의  $^3\text{H}$ -mannitol 농도를 scintillation counter를 이용하여 정량하였다. 각각의 샘플 중의 약물 농도를 HPLC를 이용하여 정량하였다. 대표적인 P-gp inhibitor인 verapamil을 apical side에 첨가한 후, 위에 기술된 방법에 따라 vinblastine의 B to A permeability를 측정한 후, 아래 기술된 식(equation)을 이용하여 verapamil에 의한 vinblastine의 세포막투과에 대한 % inhibition 값을 계산하였다.

$$\% I = 100 - \left( \frac{P_{\text{app(B-A)}}}{P_{\text{app(B-A)}}^i} \right) \times 100$$

$P_{\text{app(B-A)}}$ : P-gp substrates의 B-A 세포막 투과계수

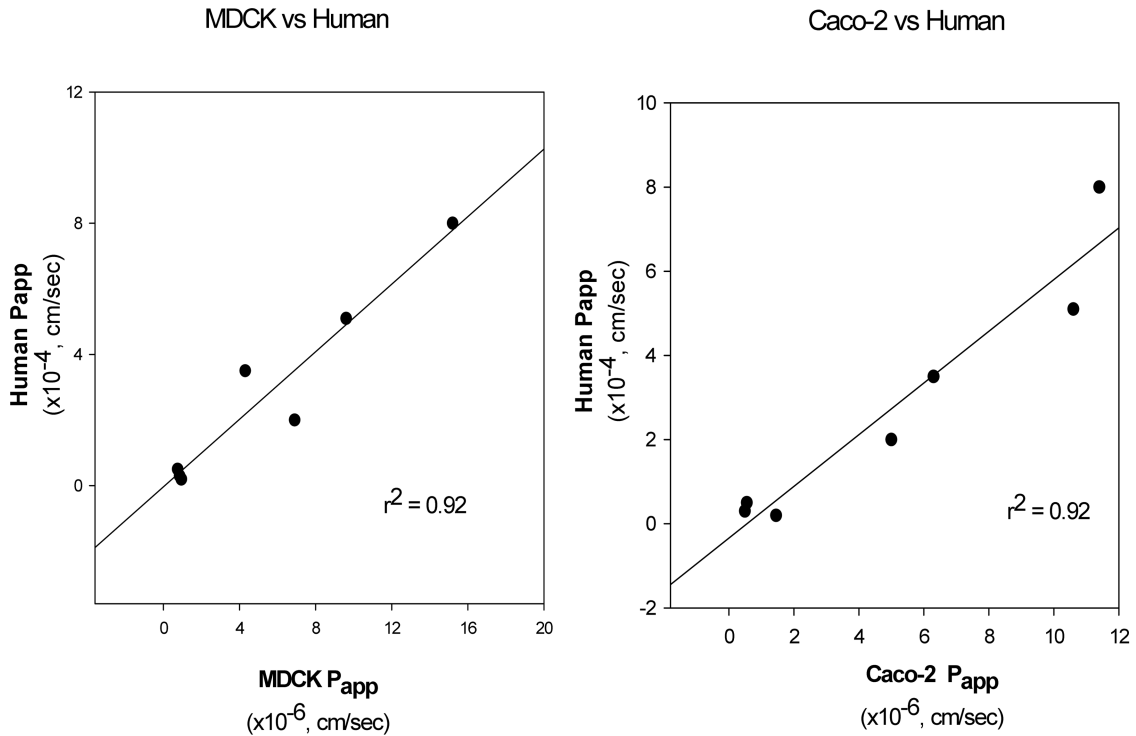
$P_{\text{app(B-A)}}^i$ : Inhibitor 존재하의 P-gp substrate의 B to A 세포막 투과계수

### P-gp induction study

MDCK cell을 각각 6-well plate에 seeding한 후, 이틀 후에 rifampin을 첨가하여 cell을 배양하였다. 배양 후 각각 3, 7, 14일이 되었을 때 각각의 well로부터 배양액을 제거한 후 세포층을 ice-cold PBS 완충액으로 3번 씻어주었다. 세포를 터트린 후에 얻어진 샘플에 대해 western blot을 이용하여 P-gp의 발현 정도를 측정하였다.

**Table I**—Apparent Permeability of 13 Model Drugs in Caco-2 and MDCK Cells (Mean  $\pm$  SD, n = 6)

BCS Class	Drug	Caco-2 $P_{\text{app}}$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)	MDCK $P_{\text{app}}$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)
Class I	Antipyrine	6.3 $\pm$ 0.92	4.3 $\pm$ 0.74
Class I	Caffeine	9.1 $\pm$ 0.62	8.9 $\pm$ 2.5
Class I	Metoprolol	5.0 $\pm$ 0.52	6.9 $\pm$ 1.7
Class I	Phenylalanine	11 $\pm$ 3.4	9.6 $\pm$ 1.4
Class I	Theophylline	5.7 $\pm$ 0.31	1.5 $\pm$ 0.17
Class II	Naproxen	11 $\pm$ 1.2	15 $\pm$ 3.2
Class II	Piroxicam	42 $\pm$ 6.6	62 $\pm$ 16
Class III	Atenolol	1.5 $\pm$ 0.16	0.94 $\pm$ 0.43
Class III	Fexofenadine	0.08 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.04
Class III	Ranitidine	0.55 $\pm$ 0.21	0.75 $\pm$ 0.63
Class III	Tetracycline	0.09 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01
Class IV	Furosemide	0.49 $\pm$ 0.09	0.85 $\pm$ 0.46
Class IV	Ofloxacin	0.86 $\pm$ 0.25	0.11 $\pm$ 0.02



\*Note: human permeability obtained from reference (12)-(14).

Figure 1—Correlation between in-vitro permeability and human permeability.

**결과 및 고찰**

**In-vitro cell growth 비교**

Caco-2 cell은 seeding 후 2주 정도가 지나야 TEER값이 일정하게 유지되는 반면에, MDCK cell은 170,000 cells/cm<sup>2</sup> density로 seeding했을 경우는 3일, 60,000 cells/cm<sup>2</sup> density로 seeding했을 경우는 5-6일 경과한 후에 일정한 TEER 값을 나타내는 것으로 보아, tight junction network 형성에 소요되는 세포배양 시간이 훨씬 단축될 수 있음을 알 수 있었다. 또한, TEER value 도 MDCK cell은 200-300 Ωcm<sup>2</sup> 정도로 Caco-2 cell의 600-800 Ωcm<sup>2</sup>에 비해 더 낮게 나타나, 종종 in-vivo에 비해 Caco-2 cell에서 약물흡수가 저조하게 평가되는 단점을 개선할 수 있는 가능성을 보여주었다.

**모델약물들의 세포막 투과계수 측정 및 BCS에의 응용**

BCS I-IV를 고르게 포함할 수 있도록 선정된 13종의 모델약물들에 대해, Caco-2와 MDCK cell을 이용하여 세포막 투과계수를 측정 후 그 결과를 <Table I>, <Figure 1>과 <Figure 2>에 요약하였다. <Figure 1>에서 보는 바와 같이, MDCK cell과 Caco-2 cell에서의 permeability 값이 human

에서의 permeability 값과 좋은 상관관계(rank order relationship)를 보임으로써, 이들 in-vitro 실험계가 human permeability를 예측 (rank order) 하는데 있어서 유용하게 사용될 수도 있음을 암시하였다. 그러나, 이들 세포실험계를 이용하여 보다 정확한 human permeability를 예측하기 위해서는 본 실험에서 선정된 약물 이외에 다양한 구조를 갖는 더 많은 모델 약물들을 이용하여 in-vitro permeability와 human permeability간의 상관관계를 평가하는 작업이 필요할 것이다. 다만, 현재로서는 비교에 이용할 수 있는 human permeability 값이 매우 제한적이어서 in-vitro permeability와 human permeability 간의 상관관계에 대한 신뢰성 있는 검증작업에는 그 한계가 있다. Caco-2 cell과 MDCK cell에서 얻어진 세포막 투과 계수(Table I)를 이용하여 13종의 모델약물들을 BCS에 따라 분류한 후, 이를 사람에서의 소장 내 흡수정도에 따른 BCS 분류 결과와 비교 분석하였다. <Table I>와 <Figure 2>에서 보는 바와 같이, metoprolol(사람에서의 소장내흡수가90% 이상)을 기준으로 약물을 High permeability와 Low permeability group으로 분류할 경우, Caco-2 cell은 13개의 모델 약물들을 모두 사람에서와 동일한 Class로 분류한 반면에, MDCK cell은 antipyrine과

	High Solubility	Low Solubility		High Solubility	Low Solubility
High Permeability	CLASS 1 Antipyrine Caffeine Metoprolol Phenylalanine Theophylline	CLASS 2 Naproxen Piroxicam	1	1	2
	CLASS 3 Atenolol Fexofenadine Ranitidine Tetracycline	CLASS 4 Furosemide Ofloxacin			

(A) Classification by Human absorption (B) Classification by Caco-2 permeability

	High Solubility	Low Solubility		High Solubility	Low Solubility
High Permeability	CLASS 1 Caffeine Metoprolol Phenylalanine	CLASS 2 <u>Antipyrine</u> Naproxen Piroxicam <u>Theophylline</u>	1	1	2
	CLASS 3 Atenolol Fexofenadine Ranitidine Tetracycline	CLASS 4 Furosemide Ofloxacin			

(C) Classification by MDCK cell permeability

Figure 2—Classification of 13 model drugs based on BCS.

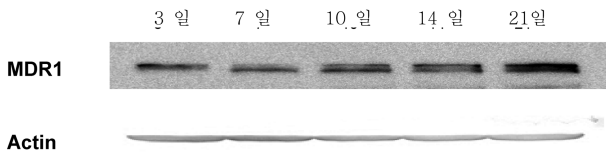
theophylline을 제외한 11개의 약물들만이 올바르게 분류되었다. 따라서 본 실험 결과는 BCS에 의한 약물분류의 경우, Caco-2 cell이 MDCK cell 보다 더 적절하게 활용될 수 있음을 암시하였다.

**P-gp inhibition study**

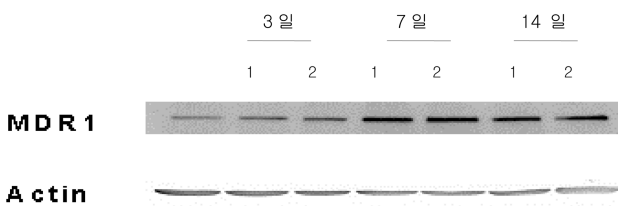
<Figure 3>에서 보는 바와 같이, 시간이 경과함에 따라 MDCK cell에서 P-gp 발현 정도는 증가하는 경향을 보였다. 3일에서 14일까지는 P-gp의 발현이 2배정도 증가하였으며, 14 일에서 21일 사이에 다시 약 2배 정도 더 증가함을 볼 수 있었다. 따라서, P-gp 발현 정도를 감안할 때, MDCK

cell도 Caco-2 cell에서와 마찬가지로 seeding 후 3주 정도 경과하였을 때, inhibition study를 수행하는 것이 효과적인 것으로 사료된다. MDCK cell에서 vinblastine의 세포막 투과계수를 측정 한 결과  $P_{app(A-B)}$ 는  $0.60 \pm 0.3$ ,  $P_{app(B-A)}$ 는  $3.02 \pm 0.94$ 이었다. 따라서 대표적인 P-gp substrate인 vinblastine의 경우  $P_{app(B-A)}/P_{app(A-B)}$  ratio가 5 정도로 MDCK cell에서 vinblastine의 efflux가 현저하게 관측되었다. 시간에 따른 P-gp 발현 정도에 관한 western blot data (Figure 3)와 vinblastine의 세포막 투과계수를 고려해 볼 때, MDCK cell이 P-gp에 의한 efflux 실험 모델로서 적절하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 대표적인 P-gp inhibitor 인

## (a) Time-dependent P-gp expression in MDCK cells



## (b) P-gp expression after the treatment of rifampin



1: w/o rifampin, 2: w/ rifampin

Figure 3-P-gp expression in MDCK cells.

verapamil을 함께 처리하였을 때에는, vinblastine의  $P_{app(B-A)}$ 가  $1.87 \pm 0.36$ 으로 나타나, vinblastine의 efflux가 38% 정도 감소됨이 관측되었다. 따라서, MDCK cell이 Caco-2 cell과 마찬가지로 P-gp inhibition study에도 유용하게 사용될 수 있는 in-vitro 실험계임을 알 수 있었다.

#### P-gp induction study

<Figure 3>에서 보는 바와 같이, MDCK cell에 rifampin을 3, 7, 14일 동안 처리한 후, P-gp의 발현 정도를 rifampin을 처리하지 않은 세포와 비교해 보았을 때 별다른 차이가 없었다.(1 vs 2)

David R. Foster et al.<sup>7)</sup>의 보고에 의하면 rifampin을 이용하여 Caco-2 cell 및 LS174T cell을 비롯한 일련의 carcinoma cell line에서 induction test를 수행하였을 때, 24시간과 48시간 배양 후 mRNA level을 측정해 본 결과 LS174T cell은 현저한 ABCB1(P-gp)의 증가를 볼 수 있었지만 Caco-2에서는 오히려 down-regulation이 일어나거나(24 hr 처치) 아무런 효과를 보여주지 못하였다(48 hr 처치). 또한 Oliver Burk et al.<sup>8)</sup>도 LS174T cell에서 rifampin을 48 hr까지 처리했을 때, 역시 시간에 따른 MDR1의 증가를 보고하였다. 따라서, 본 연구 결과와 문헌에 보고된 타 연구

결과를 종합해 볼 때, 48 hr의 배양에도 MDR1의 높은 증가를 보여주는 LS174T cell에 비해, 그 보다 오랜 기간 동안의 배양에도 약물에 의한 P-gp의 뚜렷한 증가를 볼 수 없는 MDCK cell은 P-gp의 induction 정도를 평가하기 위한 in-vitro 실험계로는 적합하지 않은 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구를 바탕으로 BCS에 의한 약물분류의 경우 Caco-2 cell이 MDCK cell 보다 더 적절하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 MDCK cell은 P-gp inhibition을 평가하는 in-vitro 실험계로는 적절하나, 약물에 의한 P-gp induction 정도를 평가하기 위한 in-vitro 실험계로는 적합하지 않음을 알 수 있었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2006년도 식품의약품안전청의 용역연구개발사업의 지원으로 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) Shah P, Jogani V, Bagchi T and Misra A, Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 186-98 (2006).
- 2) Tang F, Horie K and Borchardt RT, Are MDCK cells transfected with the human MDR1 gene a good model of the human intestinal mucosa?, *Pharm. Res.*, **19**, 765-72 (2002).
- 3) G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah and J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharm. Res.*, **12**, 413-420 (1995).
- 4) R. L. Juliano and V. Ling., A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochem. Biophys. Acta.*, **455**, 152-162 (1976).
- 5) A. H. Schinkel, C. A. Mol, E. Wagenaar, L. van Deemter, J. J. Smit and P. Borst. Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice, *Eur. J. Cancer*, **31A**, 1295-1298 (1995).
- 6) C-Y. Wu and L.Z. Benet, Predicting drug disposition via application of BCS Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, *Pharm. Res.*, **22**, 11-23 (2005).
- 7) R. Huang, D.J. Murry, D. Kolwankar, S.D. Hall and D.R. Foster, Vincristine transcriptional regulation of efflux drug transporters in carcinoma cell lines, *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 695-1704 (2006).

- 8) A. Geick, M. Eichelbaum and O. Burk, Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin, *J. Biol. Chem.*, **276**, 14581-7 (2001).
- 9) Löbenberg R and Amidon GL., Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 3-12 (2000).
- 10) Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H and Tokuda H, Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **10**, 195-204 (2000).
- 11) Volpe DA., Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 712-25, (2008).
- 12) Takamatsu N, Kim ON, Welage LS, Idkaidek NM, Hayashi Y, Barnett J, Yamamoto R, Lipka E, Lennernäs H, Hussain A, Lesko L and Amidon GL., Human jejunal permeability of two polar drugs: cimetidine and ranitidine, *Pharm. Res.*, **18**, 742-4 (2001).
- 13) Winiwarter S, Bonham NM, Ax F, Hallberg A, Lennernäs H and Karlén A., Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach, *J. Med. Chem.*, **41**, 4939-49 (1998).
- 14) Takamatsu N, Welage LS, Idkaidek NM, Liu DY, Lee PI, Hayashi Y, Rhie JK, Lennernäs H, Barnett JL, Shah VP, Lesko L and Amidon GL, Human intestinal permeability of piroxicam, propranolol, phenylalanine, and PEG 400 determined by jejunal perfusion, *Pharm. Res.*, **14**, 1127-32 (1997).