

反应性代谢产物的研究进展

甘 慧, 窦桂芳*

(军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850)

摘要: 大部分药物经体内代谢转化为无活性产物排出体外, 部分药物经药物代谢酶转化为活性代谢产物和反应性代谢产物, 其中反应性代谢产物可与肝细胞内大分子共价结合, 通过不同的机制造成药物诱导的器官损伤。鉴别这些反应性代谢产物对于设计候选新药的毒性控制以及临床用药非常重要, 本综述概述了反应性代谢产物的分类、其引起的药物毒性以及目前高通量搜索和鉴定反应性代谢产物等相关实验进展, 讨论了处理反应性代谢产物的策略及本领域未来的发展。

关键词: 生物激活; 反应性代谢产物; 药物与蛋白共价加和物

中图分类号: R969.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-0440(2007)05-0351-05

Advances in research on the reactive metabolites

GAN Hui, DOU Gui-fang

(Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Most drugs are changed to inactive metabolites *in vivo* and then excreted, while some drugs are transformed into active metabolites and reactive metabolites through metabolite enzymes' bioactivation. The reactive metabolites can covalently modify proteins, which is considered as an initial step that may lead to drug-induced organ toxicity. So characterization of reactive metabolites is critical for designing new drug candidates with improved toxicological profiles and clinical applications. In this review, a brief description of reactive metabolites is followed by a discussion on the active metabolite-induced toxicity. Experimental approaches employed for high-throughput screening and characterization of reactive metabolite formation are also described, along with strategies for dealing with reactive metabolites in drug development and clinical treatment. In conclusion, the challenges and future needs in this field of research are discussed.

Key words: bioactivation; reactive metabolite; covalent drug protein adduct

代谢过程是将内源和外源物质转化成亲水物质从而促进其在体内的清除, 通常被认为是一个解毒过程。尽管多数情况下, 代谢物毒性相对于母药要低些, 但药物经过生物激活而形成有更强烈毒性活性物的实例也并不少见, 包括近年来引起广泛关注的苏丹红。自从 Miller^[1] 揭示了某些代谢产物共价

修饰了 DNA 和蛋白与化合物诱导的细胞毒性之间的关系开始, 大量的证据表明, 许多药物能通过代谢激活形成这些代谢产物, 其能共价结合生物大分子, 导致细胞损伤并最终产生药物诱导的毒性作用^[2], 这类代谢产物也被称之为反应性代谢产物。

反应性代谢产物可与肝细胞内大分子物质(蛋白、核酸等)共价结合, 干扰或破坏细胞的正常代谢或结构, 造成肝细胞变性坏死或胆汁淤滞等后果。对于药物开发, 生物激活是个不能忽略的问题^[3], 需要高通量搜索候选药物产生反应性代谢产物的趋向性, 以及对反应性代谢产物定性和分类, 以便能在药物筛选早期调整和发现问题化合物; 对于临床, 合

收稿日期: 2007-06-15

作者简介: 甘 慧, 女, 博士, 研究方向: 药物代谢, Tel: 010-63796513, E-mail: ganhui@eyou.com

* 通讯作者: 窦桂芳, 女, 研究员, 研究方向: 药物代谢与药代动力学, Tel: 010-63751728, E-mail: douguifang@vip.163.com

理的药物剂量、联合用药方案以及对于反应性代谢产物引起机体毒性的治疗则更受关注。

本文综述了反应性代谢产物的分类、其引起的药物毒性,以及在药物开发中处理反应性代谢产物的最新实验进展,尤其是运用 LC-MS 鉴定反应性代谢产物和蛋白靶标的相关策略和技术,随后讨论了在药物开发和发展、临床应用中处理反应性代谢产物的策略,最后在正确对待反应性代谢产物和药物诱发毒性之间关系的基础上,阐述了其面临的挑战和将来需求。

1 反应性代谢产物的分类

反应性代谢产物能被广泛地分为亲电子物质和自由基。

1.1 亲电子物质

亲电子物质是指具有捕获电子或容纳额外电子的一类化合物,在多数情况下,是依赖细胞色素氧化酶(cytochrome P450, CYP450)氧化生成的代谢物。大多数反应性代谢产物都是亲电子试剂,能够与细胞内亲核物质(即含电子基团的物质,如大分子蛋白的巯基)共享电子,而诱发毒性效应。亲电子物质能被分为硬或软两类,原位的阳性处理使亲电子试剂硬化,而离开原位的处理使其软化。同样,亲核物质也被分为硬或软两类。例如:含硫核比含氮核软,因为硫原子要大,单对电子远离核更加分散。通常,硬的亲电子试剂倾向与硬核反应,软的亲电子试剂倾向与软核反应^[4]。

1.2 自由基

自由基是指含有未配对(奇数)电子的分子、原子或化学基团。包含未成对电子的自由基,通常从分子中抽出一个氢原子,造成新的自由基和引发一系列链式反应,也称为氧化应激反应,可引起许多大分子物质的过氧化损伤。例如:脂质过氧化可引起膜损伤;蛋白质(酶)氧化可引起钙转运障碍;氨基酸氧化可引起谷胱甘肽(GSH)耗竭;核酸氧化可引起DNA突变;糖氧化(免疫系统)可诱发免疫反应。

2 反应性代谢产物介导的药物毒性

肝脏是药物在体内最主要的代谢场所,药物经代谢产生亲电子物、自由基等毒性产物,干扰或破坏肝细胞的代谢和结构,导致肝细胞变性坏死,甚至癌变畸变,这些药物不仅引起肝脏损害,还可使胃肠、肾、胰等多种脏器受损。随着各种新药的广泛应用

以及联合用药的增多,药源性肝损伤的发生率逐年增高,报道显示,约25%暴发性肝功能衰竭患者和近50%肝功能异常患者与用药有关^[5]。

2.1 亲电子物质

体内GSH等通常与反应性代谢产物亲电子中心结合而解毒,当亲电子物的产生超过了体内解毒能力时,就可能产生一系列细胞毒性:(1)钙转运障碍:位于细胞浆膜及内质网的钙离子转运系统,含有半胱氨酸巯基(-SH)基团,亲电子物质与该-SH基团结合,导致钙离子转运障碍,肝细胞坏死凋亡;(2)DNA突变:细胞核内的DNA,也是亲电子物质的靶分子,如与其共价连接,可引起DNA突变。例如黄曲霉素B₁的环氧化物与DNA的N-7位置上的鸟嘌呤残基结合,可诱发肝癌;(3)新抗原生成:亲电子物质与巨分子物质共价连接所形成的巨分子复合物,形成新抗原,可诱发自身免疫性肝损害。例如对乙酰氨基酚,在正常情况下,绝大部分的对乙酰氨基酚与葡萄糖醛酸和硫酸结合而解毒,但也有一部分在CYP1A2, 2E1和3A4的作用下,转化为反应性代谢产物NAPQI。在治疗剂量时,NAPQI与GSH结合形成硫醇尿酸和半胱氨酸衍生物而解毒,但过量的服用对乙酰氨基酚可耗竭肝细胞内的GSH, NAPQI便与细胞内大分子结合,造成肝细胞损伤, CYP450的诱导剂可加重对乙酰氨基酚引起的肝损伤。

2.2 自由基

药物在氧化还原循环中形成的代谢物能接受一个不成对电子形成自由基,后者与氧作用产生一个超氧阴离子,进而引起脂质过氧化和巯基氧化造成肝细胞损伤,另外氧自由基可影响CYP450的活性,使GSH不能维持其还原状态而加重肝细胞损伤。自由基损伤肝细胞的典型例子是四氯化碳,其在CYP2E1和CYP3A4参与下形成的自由基团(CCL₃·)作用于膜系统的不饱和脂肪酸的双键,产生过氧化作用,改变膜的流动性与通透性,也影响内质网、线粒体等细胞器的功能。内质网的损伤使蛋白质的合成减少,甘油三酯与蛋白质结合形成脂蛋白的过程受阻;同时线粒体的损伤可使脂肪的代谢降低,从而引起肝内脂肪积聚和脂肪变性,进一步则导致肝细胞坏死^[6]。

2.3 免疫损害

药物代谢产物作为半抗原,与体内大分子载体(如蛋白质、多肽及多糖等)发生不可逆性结合,形

成共价结合的全抗原,刺激机体产生相应的抗体,并致敏机体,发生免疫性肝损害,导致自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的发生。活性代谢产物免疫损害的典型例子是氟烷类麻醉剂。氟烷的反应性代谢产物可与多种微粒体蛋白结合,其中 CYP2E1 是反应性代谢物和最相关自身抗体优先作用的靶分子,氟烷在 CYP2E1 作用下形成三氟乙酰氯化物(CF_3COCl),后者与肝细胞内质网中含赖氨酸残基的 ϵ -氨基多肽结合,形成新的抗原,从而激起免疫反应,造成免疫性肝细胞损伤^[7]。替尼酸经 CYP2C9 代谢产生反应性代谢产物,后者可选择性的与 CYP2C9 共价结合形成新的抗原,产生自身抗体。CYP1A2 参与双胍屈嗪反应性代谢物的产生,该代谢物与 CYP1A2 共价结合形成新抗原。

3 反应性代谢产物检测方法

反应性代谢产物通常半衰期短,在循环血中难以检测。许多体外方法被尝试以监测候选药物生物激活的可能性,这能给予药物毒性预测一些有价值的信息。目前已有部分技术被开发,它们包括:(1)评价对蛋白的共价结合;(2)诱捕和定义反应性代谢产物;(3)时间和辅助因子依赖的 CYP450 抑制。

3.1 评价对蛋白的共价结合

检测甚至定量反应性代谢产物的一个最重要的方法是放射性同位素标记化合物,利用³H、¹⁴C 等标记化合物以检测反应性代谢产物对生物大分子的不可逆结合。因为肝脏是药物代谢的主要部位,体外共价结合实验经常是通过药物与添加了辅助因子的肝微粒体或者新鲜分离的肝细胞来实现,检测存留在蛋白分子上的放射性来评价形成的共价加和物水平,以 $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 来表示^[8]。从定量的观点,化合物共价结合 $> 50 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白可能有潜在的组织毒性。共价结合实验的目的是辅助药物的选择开发,以保证候选药物在动物和人体只存在低的生物激活倾向。这个数字($50 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)不能当作是个绝对界限来评价超过此阈的化合物就不能被开发,因为还有许多其他的因素必须综合考虑,包括:候选药物潜在的临床价值,指示的严格度(如风险和利润等),临床剂量和给药方案,靶标的广泛性等。

3.2 诱捕和鉴定反应性代谢产物

化学诱捕被广泛用在反应性代谢产物识别上,主要通过受试化合物与诱捕剂形成稳定加和物,检

测手段有 LC-MS/MS 和核磁共振光谱。实验主要是利用肝微粒体,加入 NADPH 和合适的亲核诱捕试剂,如巯基(谷胱甘肽,其乙酯衍化物或 *N*-乙酰半胱氨酸),胺(氨基脒和甲基野芝麻花碱)或者氰化物^[9]。GSH 包括了一个自由巯基组、一个软核,能够广泛地和反应性亲电子物质发生反应,这些物质包括 Michael 受体、环氧化物、芳烃氧化物、氮鎓离子(nitrenium)和烷基卤化物。GSH 存在于所有的哺乳动物组织中,是体内反应性代谢产物的天然清除剂,利用相应的 GSH 乙酯类似物已经显示能够增加质谱在检测反应性代谢产物的敏感度;氨基脒和甲氧基胺基团是硬核,它们能选择性地与醛等硬的亲电子物质反应;氰化物是硬核,通常被用来有效地诱捕亚胺类物质,在体外不同的诱捕反应被用作捕捉反应性中间代谢产物以鉴定结构。

用旋转诱捕试剂捕捉自由基的技术已经建立完善。旋转诱捕剂通常是 C-亚硝基化合物或者硝酮,它们能迅速与自由基反应形成稳定的硝基氧自由基加合物。t-NB (tert-nitrosobutane)、PBN (phenyl-tert-butyl nitron) 和 4-POBN [α -(4-pyridyl *N*-oxide)-*N*-tert-butyl nitron] 等也是较好的自旋捕集剂,这类不饱和的抗磁功能基团与 OH 自由基等反应,生成较稳定的自旋加合物。最近,LC-电子顺磁共振(electron spin resonance, ESR) 光谱联用以及 LC-MS/MS 也已被发展用来在体内外分离和鉴定旋转诱捕自由基加合物^[10]。

3.3 时间和辅助因子依赖的 CYP450 抑制

某些情况下,CYP 诱导药物的生物激活导致反应性中间产物的形成,反应性中间产物不可逆结合酶的活性中心,导致了酶活性的丢失。在这种机制为基础的抑制中,抑制物移走后酶的活性也不能恢复,通常需要至少一个循环的 CYP 催化反应来恢复活性。机制基础的抑制需要 NADPH 共作用因子的存在,同时还是时间依赖的过程。因此,在体外时间和协同作用因子依赖的 CYP 抑制反应是重要的检索反应性代谢产物生成的实验。CYP 抑制实验是体外常规的实验,主要是通过人肝微粒体与候选药物进行孵育,添加 CYP 同工酶模式底物,LC-MS/MS 或荧光方法来定量模式底物的代谢,并以此检测受试化合物的代谢^[11]。实验得到灭活的平衡解离常数(K_i)、灭活以形成失活复合物的速度常数(k_{inact}), k_{inact}/K_i 通常作为体外机制基础的抑制能力的指示。在时间依赖性抑制(time-dependent inhibition, TDI)

实验中阳性出现表明能共价结合代谢酶的反应性中间代谢产物的形成。

反应性代谢产物其它相关的研究还包括^[12,13]：定量反应性代谢产物的形成,例如酰基葡萄糖醛酸化物的半定量、酰基转移的半定量分析;鉴定反应性代谢产物与 CYP450 的加合物;鉴定反应性代谢产物的蛋白靶标;鉴定反应性亲电子试剂的蛋白结合位点等。

4 处理反应性代谢产物的策略

4.1 药物的开发和应用

在评价反应性代谢产物形成与药物开发中有许多的冲突和矛盾:证据表明药物代谢激活到产生毒性反应之间有联系,但显然有些化合物能在体外共价结合蛋白却不导致组织损伤;一些反应性中间代谢产物是药物诱导毒性的传递者,而有一些(即使结构类似)则不是,目前尚不能明确预测哪些反应性代谢产物是毒性的;实际上,许多上市的药物在一定程度上都有可能形成反应性代谢产物。如果所有产生反应性代谢产物的药物从发展阶段就被中止,那么许多好的候选药物就会丢失,因此谨慎和判断是必要的。

在药物开发和应用中,对于反应性代谢产物,通常的过程是在前期优化过程中检索候选药物形成反应性代谢产物的趋向性,鉴别反应性代谢产物的性质并定义其潜在的生物激活机制,最后通过合理的改构来清除或减小反应性代谢产物的形成。反应性代谢产物的形成并不总是被排除,这取决于风险和利润的权衡考虑。一方面,要考虑的因素包括药物应用前景是否满足特定医学和疾病的需求;一方面,要考虑是否产生反应性代谢产物的通路为其主要代谢通路,是否有其它证据表明在临床前动物模型上会产生药物诱导的毒性,其它因素还包括有效人用剂量是否处于低剂量水平以及剂量执行的严格程度^[3,14]。在产生反应性代谢产物的药物中,那些高效只需要低剂量的药物相对于高剂量的药物产生的毒性要小得多,例如:氯氮平和奥氮平(olanzapine)都会经过生物激活形成氮离子类反应性代谢物,奥氮平日用剂量为 10 mg,而氯氮平是 300 mg,氯氮平产生肝毒性而奥氮平则没有。

减小反应性代谢产物的形成最合乎逻辑的方法是避免可能形成反应性代谢产物的功能基团^[15]。关于那些可能形成人体毒性相关的反应性代谢产物

的功能基团有许多指征,已报道具有生物激活高风险的亚结构包括:烷基卤化物、芳胺、含硝基的芳香物、联胺、醌、Michael 受体、环氧化物、呋喃、噻吩、异氰酸盐、乙炔、亚甲基二氧苯基等^[9,14]。另外就是发展快速、高效的技术和方法,用作鉴定母化合物或代谢物潜在毒性。质谱和硅片技术近年来获得广泛的应用,随着将来体内外数据的不断充实以及 *in silico* 模型对预测准确性的提高,反应性代谢产物能更快速地被鉴别^[16]。

4.2 反应性代谢物引起药源性肝损害的治疗与预防

反应性代谢物等引起药源性肝损害,迄今尚缺乏特异的治疗方法,其处理对策以预防为主,定期监测,早期诊断和治疗。GSH 是体内代谢清除亲电子物质及自由基的最关键成分,因此促进体内 GSH 的合成或提供外源性的 GSH,将可阻断或减轻药物导致肝损害。目前有几种特殊解毒剂已用于临床:(1)补充外源性 *N*-乙酰半胱氨酸(acetylcysteine,痰易净),可促进 GSH 的合成,但应掌握补充时机,愈早愈好,例如对乙酰氨基酚中毒性肝损害可用 *N*-乙酰半胱氨酸治疗。(2)补充外源性 GSH,防止细胞内 GSH 的耗竭,与反应性代谢物结合,促进其从尿中排泄,从而减轻肝毒性。常用制剂为古拉定,即还原型 GSH。(3)维生素 C(Vit C)和维生素 E(Vit E)是两种天然的抗氧化剂,对药物所致的急性肝损害,在应用 GSH 基础上,可用大量维生素 C 辅助 GSH 解毒的作用。轻度患者 Vit C 及 Vit E 口服即可,异烟肼等引起的肝损害可用较大剂量的维生素 B₆ 静脉滴注治疗。

5 挑战和机遇

随着现在色谱技术的发展,检测和鉴定药物的生物激活相对容易和直接得多,高通量的药物分子扫描能初步检测其形成反应性代谢产物的倾向性。具有生物激活高风险典型的亚结构被部分找出,超过 50 个共价结合蛋白(主要是胞质和微粒体蛋白)已经被鉴定,对乙酰氨基酚、溴苯、氟烷等反应性代谢产物被确认是蛋白靶标,也有一些蛋白可以作为反应性代谢产物的清除剂而起到细胞毒保护作用,对于反应性代谢产物导致的肝损伤及相关治疗也先后有报道。

尽管如此,关于反应性代谢产物的研究尚处在初始阶段,对于反应性中间代谢物的形成和消除以

及其对细胞的损伤机制仍然了解较少。反应性代谢产物的形成,与生物大分子的共价结合能作为一个毒性指征,然而没有对其参与药物毒副作用机制的全面了解,目前很难确切评价这一指标。以质谱为基础的蛋白质组学和基因组学以及系统生物学的发展,将为代谢激活、药物-蛋白加合物形成、紧随的毒性等之间因果关系的进一步了解带来机遇^[17]。代谢组学、毒理基因组学以及药物基因组学代表了最新的实验进展^[18],它们将提供给药后的生物系统一个复杂的全景图,这些学科的联合将毫无疑问地推动反应性代谢产物在药物诱导的毒性领域上的研究。

参 考 文 献

- [1] Miller JA. Carcinogenesis by chemicals: an overview - G. H. A. Clowes memorial lecture[J]. *Cancer Res*, 1970, 30(3):559 - 576.
- [2] Zhou S, Chan E, Duan W, *et al.* Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance[J]. *Drug Metab Rev*, 2005, 37(1):41 - 213.
- [3] Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith DA, *et al.* Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development[J]. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17(1):3 - 16.
- [4] Ma S, Subramanian R. Detecting and characterizing reactive metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2006, 41(9):1121 - 1139.
- [5] Zimmerman HJ. Drug-induced liver disease[J]. *Clin Liver Dis*, 2000, 4(1):73 - 96.
- [6] Boll M, Weber LW, Becker E, *et al.* Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites[J]. *Z Naturforsch*, 2001, 56(7/8):649 - 659.
- [7] Villeneuve JP, Pichette V. Cytochrome P450 and liver diseases[J]. *Curr Drug Metab*, 2004, 5(3):273 - 282.
- [8] Day SH, Mao A, White R, *et al.* A semi-automated method for measuring the potential for protein covalent binding in drug discovery[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005, 52(2):278 - 285.
- [9] Kalgutkar AS, Soglia JR. Minimising the potential for metabolic activation in drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005, 1(1):91 - 142.
- [10] Qian SY, Kadiiska MB, Guo Q, *et al.* A novel protocol to identify and quantify all spin trapped free radicals from *in vitro/in vivo* interaction of HO⁻ and DMSO: LC/ESR, LC/MS, and dual spin trapping combinations[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(1):125 - 135.
- [11] Testino SA Jr, Patonay G. High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an *in vitro* cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 30(5):1459 - 1467.
- [12] Meneses-Lorente G, Sakatis MZ, Schulz-Utermoehl T, *et al.* A quantitative high-throughput trapping assay as a measurement of potential for bioactivation[J]. *Anal Biochem*, 2006, 351(2):266 - 272.
- [13] Soglia JR, Contillo LG, Kalgutkar AS, *et al.* A semiquantitative method for the determination of reactive metabolite conjugate levels *in vitro* utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry and novel quaternary ammonium glutathione analogues[J]. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19(3):480 - 490.
- [14] Kalgutkar AS, Gardner I, Obach RS, *et al.* A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups[J]. *Curr Drug Metab*, 2005, 6(3):161 - 225.
- [15] Uetrecht J. Evaluation of which reactive metabolite, if any, is responsible for a specific idiosyncratic reaction[J]. *Drug Metab Rev*, 2006, 38(4):745 - 753.
- [16] Helma C. *In silico* predictive toxicology: the state-of-the-art and strategies to predict human health effects[J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2005, 8(1):27 - 31.
- [17] Rubakhin SS, Jurchen JC, Monroe EB, *et al.* Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(12):823 - 837.
- [18] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development[J]. *Pharm Res*, 2006, 23(6):1075 - 1088.
- [19] Tortora G, Bianco R, Daniele G, *et al.* Overcoming resistance to molecularly targeted anticancer therapies: rational drug combinations based on EGFR and MAPK inhibition for solid tumours and haematologic malignancies[J]. *Drug Resist Updat*, 2007, 10(3):81 - 100.
- [20] the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(21):2129 - 2139.
- [21] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8):786 - 792.
- [22] the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(21):2129 - 2139.
- [23] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8):786 - 792.

(上接第 350 页)

the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(21):2129 - 2139.

[22] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl*