

受理号：CSZ1700057

体外诊断试剂产品注册 技术审评报告 (境内)

产品中文名称：人类 EGFR 突变基因检测试剂盒(多重荧光 PCR 法)

产品管理类别：三类 6840

申请人名称：厦门艾德生物医药科技股份有限公司

国家食品药品监督管理总局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息	3
一、 申请人名称	3
二、 申请人住所	3
三、 生产地址	3
产品审评摘要	4
一、 产品概述	4
二、 临床前研究摘要	6
三、 临床评价摘要	13
四、 风险分析及说明书提示	16
综合评价意见	18

基本信息

一、申请人名称

厦门艾德生物医药科技股份有限公司

二、申请人住所

厦门市海沧区鼎山路 39 号

三、生产地址

厦门市海沧区鼎山路 39 号

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒含有 P-EGFR 混合酶、P-EGFR 阳性对照、P-EGFR 8 联反应条和 P-EGFR 反应液，主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

试剂盒组分	主要组成成分	规格装量
P-EGFR 8 联反应条	引物、探针、dNTPs	8 条（16 测试）
P-EGFR 反应液	水、buffer、Mg 离子	247.5 μ L（16 管）
P-EGFR 混合酶	Taq DNA 聚合酶、UNG 酶	40 μ L
P-EGFR 阳性对照	质粒 DNA、野生型 DNA	400 μ L

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测晚期非小细胞肺癌（NSCLC）患者血浆 DNA 样本中人类 EGFR 突变基因。其中 19 外显子缺失、L858R 突变用于盐酸埃克替尼片的伴随诊断检测，T790M 突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测（具体可参照表 2）。

血浆 EGFR 检测敏感度尚不能达到组织样本检测水平，因此推荐用于晚期 NSCLC 患者，且作为不易获取 NSCLC 组织样本时的补充手段。如可以获得病理组织时，建议优先考虑病理组织检测结果。

表 2 伴随诊断用途的突变基因类型及相应的靶向药物

药物	突变基因
盐酸埃克替尼片	19 外显子缺失、L858R
甲磺酸奥希替尼片	T790M

注：甲磺酸奥希替尼片的功效尚未在 EGFR T790M 血浆样本检测结果阳性、同时肿瘤组织样本检测结果阴性或未知群体中确定。

下表 3 中为本试剂盒可以检出，但 EGFR 相关药物安全性和有效性尚未确定的 EGFR 突变基因类型。

表 3 药物安全性和有效性尚未确定的 EGFR 突变基因类型

药物	突变基因
盐酸埃克替尼片	G719X、20 外显子插入、T790M、S768I 和 L861Q
甲磺酸奥希替尼片	G719X、19 外显子缺失、L858R、20 外显子插入、S768I 和 L861Q

本试剂盒仅用于对 NSCLC 患者靶基因序列的检测，其检测结果仅供临床参考，不应作为患者个体化治疗的唯一依据，临床医生应结合患者病情、药物适应症、治疗反应及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

(三) 产品包装规格

12 测试/盒

(四) 产品检验原理

本试剂盒基于扩增阻碍突变系统（Amplification Refractory Mutation System, ARMS）和荧光 PCR 技术实现血浆 DNA 样本中

EGFR 突变基因的检测。

本试剂盒针对 EGFR 突变基因位点设计特异的突变检测引物。PCR 扩增时，由于该引物 3'末端的碱基与突变型模板完全配对，引物延伸并扩增出突变模板；而与野生型模板由于不能完全配对，引物的延伸被阻断，野生型模板扩增被抑制，从而实现 EGFR 突变基因的检测。

本试剂盒同时结合荧光 PCR 技术，通过 FAM/ROX/CY5 标记的荧光探针，实现 EGFR 突变基因的实时检测；另外，反应体系中还包含检测人类 EGFR 基因保守区域的引物和 HEX 标记的荧光探针，作为内控试剂用于结果判读及监控样本的质量。本试剂盒 PCR 扩增反应系统同时含有 UNG 酶，可以选择性断裂含有 dU 的 PCR 片段中的尿嘧啶糖苷键，有效降低因 PCR 产物污染产生的假阳性。

二、临床前研究摘要

（一）主要原材料

1.本产品的主要原材料包括：引物、探针、DNA 聚合酶、UNG 酶、dNTPs 等，这些原材料均为外购方式获得。

引物、探针均为申请人自行设计后由专业的合成公司合成，并经 HPLC 纯化获得；DNA 聚合酶和 UNG 酶均由原料提供商克隆表达纯化后获得；dNTPs 由原料提供商直接化学合成获得。

2.申请人选择 2 家有资质的供应商，通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商。制定了各主要原材料质量要求并经检验合格。

3.企业参考品设置情况:

申请人设计了完整的企业参考品,包括阳性参考品、阴性参考品、最低检测限参考品和精密度参考品。阴性参考品包括 EGFR 突变基因阴性血浆 DNA、EGFR 突变基因阴性且其它基因阳性(BRAF、HER2、KRAS 突变基因阳性)的血浆 DNA 和非人类基因组样本 DNA,阳性参考品、最低检测限参考品和精密度参考品采用临床 EGFR 突变阳性血浆样本 DNA、质粒 DNA、EGFR 突变阳性细胞系 DNA 与阴性血浆 DNA 混合,经数字 PCR 定量制备而成。

阳性参考品涵盖了每种突变类型,其中强阳性参考品 30 份、中阳性参考品 30 份、弱阳性参考品 30 份,共 90 份单突变阳性参考品(临床 EGFR 突变阳性血浆样本 DNA、质粒 DNA、EGFR 突变阳性细胞系 DNA 与阴性血浆 DNA 混合),1 例 L858R/T790M 双突变参考品(细胞系 DNA),共 91 份。这 91 份参考品均用数字 PCR 定量突变比例。

阴性参考品包括 8 份 EGFR 突变阴性的血浆样本 DNA、3 份 EGFR 突变阴性而其它突变基因阳性的血浆样本 DNA 和 1 份非人类基因组样本 DNA,共 12 份,经数字 PCR 和 Sanger 测序法验证均为 EGFR 突变基因阴性。

最低检测限参考品涵盖每种突变类型,由突变类型的质粒/细胞系 DNA 与健康人血浆样本混合制备,得到 1ng/μL DNA 浓度下 0.2-0.8%突变比例的最低检测限参考品。

精密度参考品包括强阳性精密度参考品、弱阳性精密度参考品

和阴性精密度参考品。强阳性精密度参考品涵盖了 18 种突变类型（临床 EGFR 突变阳性血浆样本 DNA、质粒 DNA 与阴性血浆 DNA 混合），共 18 份；弱阳性精密度参考品涵盖了 30 种突变类型（临床 EGFR 突变阳性血浆样本 DNA、质粒 DNA 与阴性血浆 DNA 混合），共 30 份；阴性精密度参考品 3 份（临床 EGFR 突变阴性血浆样本 DNA）。其中，强阳性和弱阳性精密度参考品的突变比例分别为 50% 和 1%，所有精密度参考品均经过数字 PCR 验证。

本试剂盒设置了阳性对照质控品，内含有突变质粒和野生型 DNA，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制；此外，每管反应体系还设置了内控（人类 EGFR 基因保守区域），用于检测结果的判读及监控样本的质量。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过使用初步确定的配方进行反应体系配制，以企业 EGFR 参考品/质控品，对反应体系中的突变引物浓度、突变探针浓度、内控引物/探针浓度、Taq DNA 聚合酶、UNG 酶浓度、Mg 离子浓度、dNTPs 浓度、PCR buffer 用量、Blocker 用量、PCR 反应体积、PCR 扩增循环数、退火温度、样本 DNA 用量、PCR 适用机型（Stratagene Mx3000P™、ABI7500 和宏石 SLAN 系统）、核酸提取试剂盒（QIAamp Circulating nucleic acid Kit 和厦门艾德的核酸提取试剂）等进行筛选和优化，每种组分选择 2-4 个参数，通过功能性试验，最终确定了最佳的生产工艺和反应体系。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能包括最低检测限、精密度、阴/阳性参考品符合率、特异性（交叉反应、干扰试验）、核酸提取纯化性能等。

在最低检测限评估中，用 3 批成品试剂盒（P214072505Z、P214080103Z、P214080504Z），评估特定背景 DNA 浓度（3ng/反应、7.5ng/反应和 15ng/反应），每种 EGFR 突变类型设置 3 个突变比例、20 次重复的检测；同时采用 3 批成品，评估了每种突变类型在特定突变比例下，3 个背景 DNA 浓度、20 次重复的检测情况，最终确定各突变位点不低于 95% 检出率的最低检测限为 15ng/反应 DNA 浓度下 0.2%-0.8% 突变比例。

在精密度研究中，申请人采用阴性精密度参考品、弱阳性精密度参考品（1% 突变比例）和强阳性精密度参考品（50% 突变比例）在 3 批成品试剂盒（P214072505Z、P214080103Z、P214080504Z）上分别评价了本产品的批内、批间及检测日内、日间和操作人员间精密度，结果显示 Ct 值 CV 值均在 5% 以内，表明试剂盒的批内、批间及检测日内、日间和操作人员间精密度均较好。

本试剂盒采用 91 份阳性参考品和 12 份阴性参考品在 3 批成品试剂盒（P214072505Z、P214080103Z、P214080504Z）上分别评价了试剂盒的特异性和准确度，阳性和阴性参考品的符合率均为 100%。

交叉反应评价中，申请人针对 EGFR 基因具有同源性、可能引起交叉反应的其它突变基因类型、易引起交叉反应的野生型、与非

人类基因及肺相关感染微生物等进行交叉反应评价。所用样本包括 HER2 基因质粒 DNA (10³ 拷贝/μL)、血浆样本 DNA (1ng/μL)、细菌/酵母菌/结核分枝杆菌/肺炎链球菌 DNA (1ng/μL)，经验证，上述样本与本产品均不产生交叉反应。

干扰试验结果显示血浆样本中可能存在的内源性干扰物（血红蛋白、甘油三酯、铁蛋白等，浓度分别为 2g/L、37mmol/L 和 200ng/mL），以及外源性干扰物（紫杉醇、卡铂、特罗凯、柠檬酸钠等，浓度分别为 90μg/mL、90μg/mL、90μg/mL 和 0.645mol/L），均不干扰本试剂盒的检测结果。

针对核酸提取纯化步骤，申请人对比了 Qiagen 公司的 QIAamp Circulating nucleic acid Kit 和厦门艾德的核酸提取试剂对 81 份血浆样本的 DNA 提取效率，结果显示上述两种方法核酸提取效率相当，提取样本用于本试剂盒检测，性能可满足要求。通过以上评价，选择 QIAamp Circulating nucleic acid Kit 和厦门艾德的核酸提取试剂作为本产品核酸提取方法。

本次申报产品仅包括 1 种包装规格（12 测试/盒），申请人提供了三批产品（P214072505Z、P214080103Z、P214080504Z）在所有适用机型上的性能评估资料。以上性能研究符合 44 号公告要求。

（四）阳性判断值研究

本产品用于阳性判定值研究的血浆样本来源于厦门艾德生物技术研究中心有限公司，该样本 EGFR 突变情况经数字 PCR 方法验证。

对于临床常见的 19-del、L858R 和 T790M 突变类型，申请人均

采用了 94 例临床样本进行检测。使用 3 批成品试剂盒 (P214072505Z、P214080103Z、P214080504Z) 在 Stratagene Mx3000P™、ABI7500 和宏石 SLAN 系统三种机型上,对提取的 DNA 进行检测,通过 SPSS 软件对 ROC 曲线进行分析,根据 Youden 指数最大值确定其阳性判定值。

对于 20-ins、S768I、G719X、L861Q 稀有突变类型,申请人使用 3 批成品试剂盒 (P214072505Z、P214080103Z、P214080504Z) 在 Stratagene Mx3000P™、ABI7500 和宏石 SLAN 系统三种机型上进行检测,采用与数字 PCR 平行对比的方法进行阳性判定值的确定,其中用于 20-ins 分析的临床样本为 45 例,其它稀有突变样本各 50 例。

通过上述检测分析,最终确定本产品阳性判断值见表 4。

表4 阳性判断值的确定

反应管管号		FAM通道	ROX通道	CY5通道
ΔCt Cut-off 值	1号管	11 (19del)	11 (L858R)	/
	2号管	8 (T790M)	/	/
	3号管	12 (G719X)	12 (L861Q)	12 (S768I)
	4号管	11 (20-ins)	/	/

$\Delta C_t \text{ 值} = C_t \text{ 值 FAM/ROX/CY5} - C_t \text{ 值 HEX/VIC}$ 。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品实时稳定性、热加速稳定性、冻融稳定性、开瓶稳定性进行研究,确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。

实时稳定性研究: 采用三批次试剂盒 (批号: P214111401Z、

P214112001Z、P214112602Z) 储存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下, 分别在 0、2、4、6、7、8、9 和 10 个月对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度进行考察, 各项性能指标均符合要求, 确定产品在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下, 可稳定保存 8 个月。

热加速稳定性研究: 将三批次成品试剂盒(批号: P214111401Z、P214112001Z、P214112602Z) 解冻后, 放置于 37°C 保存, 在第 0、3、5、7 天对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度进行考察, 结果显示, 产品在 37°C 条件下, 可稳定保存 7 天, 检测性能均满足要求。

冻融稳定性研究: 将三批次成品试剂盒(批号: P214111401Z、P214112001Z、P214112602Z) 按照规定条件于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 存储至完全结冰, 再取出置于室温完全解冻, 如此反复冻融数次, 分别在反复冻融第 0、2、4、6、8 和 10 次后对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度进行考察, 结果显示, 产品反复冻融 10 次, 性能均满足要求。

开瓶稳定性研究: 将三批次成品试剂盒(批号: P214111401Z、P214112001Z、P214112602Z) 解冻后, 拆开包装, 将 P-EGFR 8 联 PCR 反应条、P-EGFR 反应液、P-EGFR 混合酶、P-EGFR 阳性对照开盖后再盖紧, 分别置 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 和 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存。 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存的试剂盒在第 0、3、5 和 7 天, $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存的试剂盒在第 0、4、6 和 8 个月对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度进行考察。结果显示, 开瓶后的试剂盒在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存 7 天和 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存 8 个月, 各项

性能指标均满足要求。

三、临床评价摘要

(一)一致性临床研究

申请人在复旦大学附属中山医院、云南省肿瘤医院（昆明医科大学第三附属医院）、温州医科大学附属第一医院、上海市胸科医院、北京协和医院和首都医科大学附属北京胸科医院共 6 家机构完成了临床试验。采用考核试剂与已上市产品对临床样本进行比较研究试验的方法验证本产品的临床性能。入组样本为晚期（IIIB-IV 期）肺腺癌和少量非肺腺癌、肺腺癌 IA-III A 期的血浆样本，共计 1069 例。对比试剂选择已上市同类产品人类 EGFR 基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）（注册证号：国械注准 20143402001）。考核试剂与对比试剂检测结果不一致的样本或两种试剂检测均为阳性且不能具体分型的样本，采用高通量测序方法（NGS）进行序列测定。

本临床试验共检测出 373 例突变阳性样本，阳性率为 34.89%，包括 168 例 19del 突变阳性、168 例 L858R 突变阳性、69 例 T790M 突变阳性、11 例 20-ins 突变阳性、14 例 G719X 突变阳性、13 例 S768I 突变阳性、8 例 L861Q 突变阳性。

与对比试剂的比较研究结果显示，二者阳性符合率为 97.35%，阴性符合率为 89.7%，总符合率为 91.86%。采用 kappa 检验方法进行统计学分析，Kappa=0.81，显示二者具有较好的检测一致性。

在 1069 例样本中，两种试剂检测结果不一致或不完全一致的样本共 122 例，68 例样本 NGS 方法的验证结果与考核试剂检测结果

一致，42 例样本 NGS 方法的验证结果与对比试剂检测结果一致，12 例与两种方法检测结果均不一致。

申请人对 1041 例肺腺癌样本按照不同治疗疗程分为初治、复发、TKI 耐药复发组，对各种突变的组间差异进行比较，19-del 突变在酪氨酸激酶抑制剂（TKI）耐药复发组检出率最高，与其他两组有显著差异；L858R 突变在 TKI 耐药复发组检出率最高，其次是初治组，三组之间有显著性差异；T790M 突变在 TKI 耐药复发组检出率显著高于其他组；其他突变在各组中的检出率无显著差异。

（二）组织与血液样本的配对研究

统计温州医科大学附属第一医院 229 例入组样本的组织 EGFR 检测结果，其中有 203 例组织与血浆样本为同一时期采集，采用考核试剂检测血浆样本，与同一受试者既往组织检测结果（人类 EGFR 基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）国械注准 20143402001）进行对比，结果表明考核试剂血浆检测结果与组织样本检测结果阳性符合率 65.55%，与已往文献所述的结果相符。

（三）EGFR-TKI 药物疗效相关的临床研究

1. 甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）药效相关研究

AURA17 研究是一项开放性、单臂药物临床研究，旨在评估甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）在亚太地区确诊为局部晚期或转移性 NSCLC（IIIB-IV 期）、既往接受已批准 EGFR-TKI 药物治疗后出现疾病进展、EGFR T790M 突变阳性患者的安全性和疗效。此临床研究中，合计 306 名（255 例来自中国）初步符合入组条件的受试者

参与筛选。其中 277 名受试者能提供足够的组织样本，且经中心实验室检测确认，其中 183 名受试者组织样本检测出 EGFR T790M 突变阳性。这 183 名受试者后续均接受甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）治疗。在这 183 名受试者中，有 168 名受试者能提供同时期血浆样本，该产品在这 168 例血浆样本中共检测出 82 例 T790M 突变阳性。其中有 77 名受试者服用甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）后可评价疗效，评价结果为 49 例病情得到缓解，客观反应率为 63.6%（95% CI:52, 74）。

同时，申请人进行了接受甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）治疗的回顾性临床试验研究，此产品在首都医科大学附属北京胸科医院、温州医科大学附属第一医院、云南省肿瘤医院 3 家临床机构共检测出 7 名受试者血浆样本检测结果 T790M 突变阳性，受试者均为经已批准 EGFR-TKI 药物治疗后复发进展的晚期非小细胞肺癌患者。这 7 名受试者后续服用甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）后，5 例病情得到缓解，2 例病情稳定，客观反应率为 71.43%，疾病控制率为 100%。

上述研究表明，此产品可以用于帮助 NSCLC 患者选择甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）的肿瘤靶向治疗方式。

2. 盐酸埃克替尼片（凯美纳）药效相关研究

申请人进行了接受盐酸埃克替尼片（凯美纳）治疗的回顾性临床试验研究，本产品在北京胸科医院、温州医科大学附属第一医院、云南省肿瘤医院 3 家临床机构共检测出 48 例晚

期非小细胞肺癌受试者血浆样本 EGFR 敏感突变阳性。这 48 名受试者后续服用盐酸埃克替尼片（凯美纳）后，29 例病情得到缓解，18 例病情稳定，1 例病情进展，客观反应率为 60.42%，疾病控制率为 97.92%。

这项研究表明，此产品可以用于帮助 NSCLC 患者选择盐酸埃克替尼片（凯美纳）的肿瘤靶向治疗方式。

3.其它 EGFR-TKI 药效相关研究

申请人进行了接受其它 EGFR-TKI 治疗的回顾性临床试验研究，该产品在首都医科大学附属北京胸科医院、温州医科大学附属第一医院、云南省肿瘤医院 3 家中心共检测出 29 例晚期非小细胞肺癌受试者血浆样本 EGFR 敏感突变阳性。其中 27 名受试者后续服用吉非替尼（易瑞沙），2 名受试者后续服用盐酸厄洛替尼片（特罗凯）后，19 例病情得到缓解，9 例病情稳定，1 例病情进展，客观反应率为 65.52%，疾病控制率为 96.55%。但因该部分其它 EGFR-TKI 有效样本量未达到预期统计学要求，未能进行具有统计学意义的临床研究，故本次临床研究中未明确其他 EGFR-TKI 与本产品伴随关系。

综上所述，该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了全面研究，临床试验符合要求。

四、风险分析及说明书提示

参照“YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械的应用”标准，对该产品进行风险分析。经综合评价，在目前认知水平上，

认为该产品上市带来的获益/受益大于风险。

尽管目前认为该产品的受益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在产品说明书中提示以下信息：

1.适用范围：用于体外定性检测晚期 NSCLC 患者血浆 DNA 样本中人类 EGFR 突变基因。其中 19 外显子缺失、L858R 突变用于盐酸埃克替尼片的伴随诊断检测，T790M 突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测，其它稀有突变本产品检测试剂可以检出，但 EGFR 相关肿瘤药物安全性和有效性尚未确定。

2.警示及注意事项：产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，属于创新审批项目（编号：201600177）。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第 680 号）、《体外诊断试剂注册管理办法》（国家食品药品监督管理总局令 2014 年第 5 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。