

新生抗原药品关键技术考虑（征求意见稿）

国家药品监督管理局药品审评中心

2026 年 10 月

目 录

一、概述.....	1
二、 常见问题与技术考虑	2
(一) 样本采集及处理	2
(二) 测序及质控考虑	7
(三) 新生抗原筛选与鉴定.....	13
(四) 软件/算法验证及性能评估.....	20
(五) 数据库与软件/算法变更.....	24

一、概述

新生抗原（Neoantigens）是由肿瘤细胞内非同义基因突变、基因重排、翻译后异常修饰等产生的一种特殊的肿瘤特异性抗原（Tumor-specific antigens, TSAs），可被主要组织相容性复合体（Major histocompatibility Complex, MHC）分子加工和递呈给 T 细胞，从而激发机体特异性免疫应答。因其仅在肿瘤细胞中表达，具有较强的肿瘤细胞靶向性和免疫原性，被认为是肿瘤免疫治疗的理想靶点。近年来，随着高通量测序（Next Generation Sequencing, NGS）、生物信息学和人工智能（Artificial intelligence, AI）技术的飞速发展和广泛应用，新生抗原药物已成为推动个性化癌症免疫治疗发展的重要方向，具有广阔的应用前景。

目前新生抗原产品涉及多种技术路线，根据抗原表达和递呈方式的不同，当前研究较为广泛的主要包括多肽类、核酸类、细胞类等类型。该类产品的开发涉及肿瘤生物学、基因组学、生物信息学、免疫学等多学科交叉，还涉及高通量测序技术、AI 技术等新方法新技术的应用，具有研发流程复杂、技术难度高等特点。建议在产品开发过程中，结合产品设计和工艺特点，基于“质量源于设计”和“风险评估”等理念，开展工艺开发和质量控制等研究。

考虑到新生抗原产品的复杂性和特殊性，为了规范和指导该类产品的研发，制定本文件。本技术考虑基于当前的科

学认知和研发实践，主要针对个体化新生抗原产品的新生抗原预测筛选与验证、软件/算法的性能评估等关键环节的药学研究，提出一般性技术考虑，为药品注册申请人/上市许可持有人提供参考。对于共享突变或预设抗原序列开发的新生抗原产品，可参考该技术考虑。鉴于新生抗原产品的药学研究技术处于快速发展阶段，研发与评价体系亦在持续探索与完善过程中。随着该领域技术的发展、认知的深入和经验的积累，相关内容将不断修订与更新。

二、常见问题与技术考虑

（一）样本采集及处理

问题 1、样本采集的一般技术考虑？

样本采集作为新生抗原产品生产全流程的首个环节，其质量直接决定了后续抗原预测的准确性、产品生产的可行性以及最终的治疗效果。生物样本采集应符合《涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法》及《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》等相关法规的要求，明确样本用途、检测目的、遗传信息及数据使用范围、保存期限和隐私保护措施等。

申请人需结合适应症特点、取样可及性、临床取样风险及后续检测需求，合理确定肿瘤样本类型、采集部位和采集方式，并建立标准化的样本采集、运输、接收和处理流程，防止样本采集和处理过程中污染，确保样本采集和处理全过

程可追溯，并说明关键环节的质量控制措施。

（1）肿瘤组织方面

建议优先采用新鲜肿瘤组织样本，避开坏死区域，确保样本的质量。在无法获得新鲜手术样本时，可根据临床实际情况、样本可及性及检测方法学要求，选择穿刺或活检样本、福尔马林固定石蜡包埋（Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE）样本等，并建立与样本类型相适应的质量控制和分析策略。

对于穿刺或活检样本，在满足病理确认、核酸提取和后续检测最低要求的前提下，尽可能多点采样，采用多点采样时，原则上应分别处理、分别检测，并分别记录各采样点的部位、数量或大小、病理评估结果及对应检测信息，以支持后续变异一致性分析、克隆性评估和候选抗原筛选。如受临床条件、样本量或受试者风险限制无法开展多点采样，申请人应说明原因，并采取相应措施降低异质性影响。

对于因临床实际未能获得新鲜肿瘤样本而采用 FFPE 样本的，考虑到 FFPE 样本的核心损伤主要来自于：福尔马林固定（导致 DNA 交联、脱氨基）、和石蜡包埋（高温加剧核酸降解、诱发氧化损伤）以及长期存储（持续累积氧化损伤、脱氨基损伤和核酸降解等），从而导致后续测序检测时出现脱氨损伤相关的假阳性转换型变异（如 C>T/G>A）、氧化损伤相关的假阳性颠换型变异（如 C>A/G>T）、低频 indel 的假

阳性检出等风险。应尽量收集并记录可能影响样本质量的关键前处理信息（固定液类型及浓度、固定时间、脱水和包埋相关信息、切片厚度、保存条件、保存期限以及取材部位等）。针对这些损伤，可通过优化以下后续步骤系统性补偿样本质量的缺陷：

优化核酸提取：可通过脱交联修复（如延长蛋白酶 K 消化时间，充分断开甲醛交联的蛋白-DNA 共价键，或使用专用 FFPE 提取试剂盒，内置解交联缓冲液）或核酸损伤修复（在建库前采用经验证的 DNA 损伤修复酶体系）等改善 FFPE 样本数据质量。

调整文库构建策略：可通过降低 PCR 循环数（FFPE 损伤片段在 PCR 中更易产生扩增偏差，应根据起始量优化循环数，减少 PCR 引入的假阳性富集）、引入 UMI（Unique Molecular Identifier）分子标签、适当提高捕获探针用量等方法提高 FFPE 样本数据质量。

调整测序参数：适当提高测序深度，以补偿有效片段减少、噪声增加导致的灵敏度下降；使用双端测序，通过双端一致性过滤降低损伤引入的错误。

优化数据分析：针对 FFPE 样本可能出现的典型伪差建立相应的数据过滤和质控策略，重点关注 C>T/G>A 等常见损伤相关变异模式，并结合检测平台特点、文库构建方式及变异检出方法设置更严格的过滤阈值。

（2）对照组织方面

通常以外周血作为正常对照样本，用于筛选肿瘤特异性体细胞突变；若需检测来源于可变剪切、ncRNA 的异常表达及融合基因的新生抗原，建议尽量同时采用癌旁组织作为对照，以进一步排除组织相关性的可能。

此外，考虑到在血液系统恶性肿瘤或存在骨髓 / 外周血受累的实体瘤、在显著克隆性造血的高龄患者、既往接受异基因造血干细胞移植的患者等特殊情形中，以外周血作为正常对照样本可能导致体细胞变异判定系统性出错，可采用指甲、皮肤成纤维细胞或经确认的癌旁组织等替代对照，并说明选择依据，对照样本应取自细胞组分而非血浆。

问题 2、对于肿瘤异质性的特殊考虑？

考虑到肿瘤异质性可通过空间取样偏差、时间克隆演化及表型呈递缺陷等机制可能影响新生抗原筛选的准确性，并最终制约该类产品的临床有效性。为此，申请人应基于产品自身特点及目标适应症，制定合理的取样方案及针对性的异质性控制策略。尤其对于异质性较高、存在多灶性病变、治疗后残留或进展病灶等复杂情形，申请人需在研究方案设计阶段即预先规划取样及风险控制措施，并同步建立与取样方案相匹配的方法学确认及质量控制策略。

多区域取样或多点采样可作为提高异质性识别能力的可选手段，可分别记录各取样点的部位、数量或大小、病理

评估及对应检测信息并分别检测，以支持变异一致性与克隆性分析。如受临床条件限制无法多点取样时，可通过提高检测深度或覆盖能力、结合克隆性分析识别主导突变、对关键候选突变进行正交验证等方式降低肿瘤异质性的影响，并预先明确补采、复检、纳入后续筛选或终止分析的判定原则。

问题 3、肿瘤组织样本纯度要求及低纯度样本的质控考虑？

肿瘤纯度（Tumor purity）是指肿瘤组织样本中肿瘤细胞所占的比例，是决定后续测序和分析的关键变量。过低的肿瘤纯度会影响测序结果的准确性和可靠性，并可能导致测序数据分析出现偏差。肿瘤纯度直接影响低频体细胞变异的检出灵敏度，进而影响候选新生抗原的完整识别。为保证后续测序分析的准确性和可靠性，组织样本的肿瘤纯度建议不低于 20%。考虑到在特殊癌种（如胰腺癌）组织中含有大量纤维基质，导致肿瘤纯度可能较低。对于肿瘤纯度低于参考水平但仍拟继续用于后续检测和候选新生抗原筛选的样本，在患者知情后仍愿意继续治疗的情况下，申请人可结合后续技术优化（如提高测序深度、采用微切/宏切富集等策略），确保能够检出相对低频的突变，以检出足够数量的候选突变位点或关键突变位点，保证新生抗原筛选的准确性。

肿瘤纯度建议采用病理学评估（如病理医师双读），辅助流式细胞术、显微图像分析或基于测序数据的生物信息学方法进行辅助评估。

（二）测序及质控考虑

问题 1、测序样本制备的一般考虑？

NGS 测序流程复杂，由多个相对独立的步骤串联而成，且每个步骤均会对下游环节产生影响。申请人除了制定测序的整个检测流程的标准操作规程（Standard Operating Procedure, SOP）外，还应针对每个检测组成部分建立其特定检测的指标和验收标准，从而确保测序数据的准确性与可靠性，为后续新生抗原的筛选与鉴定提供坚实的基础。

核酸提取是测序的起始步骤，也是保证检测样本能如实反映患者体征的关键环节，其质量直接决定了后续数据的可信度、覆盖度和完整性。建议优先采用国家药品监督管理局批准上市的核酸提取试剂盒，并根据实际用途完成适用性验证等，在满足高通量测序要求的实验室内完成核酸提取。

申请人需建立并验证核酸提取及质量控制流程，说明所用方法、关键控制点、判定标准及不合格处置原则，并对提取核酸的浓度、纯度与完整性作出评价。核酸投入量可结合建库方法、测序平台及方法学验证结果设定，提取量下限设定可参考通用参数（如 DNA 不低于 50 ng、RNA 不低于 100 ng）。当样本提取量低于参考水平时，应重点说明在该条件下能否维持满足预期用途的有效测序深度、低频变异检出能力及分析稳定性。若采用 RNA 测序用于候选突变表达确认或其他新生抗原筛选环节，还应说明 RNA 得率及质量能否满

足相应分析要求，并在必要时提供验证资料或历史数据支持。

申请人应结合不同测序目的分别说明核酸质量要求的设定依据。对于全外显子测序（Whole Exome Sequencing, WES）和全基因组测序（Whole Genome Sequencing, WGS），一般应重点关注 DNA 的提取量、纯度和完整性。对于转录组测序（RNA sequencing, RNA-seq），除提取量外，还应重点关注 RNA 的完整性、片段分布和降解程度。若申请人拟采用统一阈值覆盖不同测序用途，应提供充分依据，证明在各应用场景下文库构建成功率、测序质量和分析结果均可满足预期要求。

核酸浓度一般建议采用 Qubit 等方法进行定量，纯度可结合 A260/A280 比值等指标进行评价，A260/A280 比值通常可参考 1.8~2.0 范围，具体接受标准应结合检测方法及验证结果确定。核酸完整性可结合电泳结果或完整性评价指标进行综合判断，如 DNA 完整性指数（DIN）、RNA 完整性指数（RIN）等。对于 FFPE 来源 RNA 等明显降解样本，申请人应说明纳入依据，并结合 DV200、片段分布等更适宜的指标进行评价。

FFPE 样本的提取前处理应与其特点相适应，一般包括充分脱蜡、去除残留固定液影响、解除交联等步骤；必要时可根据保存时间、组织状态与损伤情况采用损伤修复等适配性处理。应说明各步骤的操作要求、适用条件及对核酸质量

与下游检测的影响。

对于 FFPE 样本来源的 DNA/RNA，申请人还应充分关注固定和保存过程可能造成的核酸降解、片段化等影响，特别是在 DNA 变异检测中，应关注由胞嘧啶脱氨等损伤引起的 C>T/G>A 等伪变异；对于 RNA 测序，还应关注 RNA 降解、覆盖偏倚及由此导致的表达定量或变异识别偏差，并建立与之相适应的数据质控和分析策略。申请人应说明相应的数据过滤规则、人工复核安排及关键候选突变的正交验证策略，以降低 FFPE 相关伪差对候选新生抗原筛选结果的影响。

问题 2、文库制备及质控考虑？

文库制备是产生特定大小范围的 DNA 或 cDNA 片段的过程。申请人应根据测序平台特点制定文库构建操作流程，并建立相应的质量控制和记录要求。申报资料需提供文库构建过程的关键质控指标，并说明其控制要求及判定原则。相关指标通常包括文库浓度、片段大小分布、有效文库比例、重复率水平及变化趋势、污染及交叉污染控制情况等。申请人需说明上述指标的判定标准及异常处置原则，并建立不合格数据的处置机制。鼓励申请人积累关键参数的批间数据，为工艺稳定性评价提供依据。

对于个体化的新生抗原产品，每份产品仅针对单一患者，其突变谱因人而异，肿瘤与配对正常样本之间、或不同患者样本之间一旦发生混淆或交叉污染，将直接导致体细胞变异

判定错误，影响产品安全性和有效性。因此，申请人应建立覆盖采集、提取、建库、测序全过程的样本标识与防混淆措施。采用客观手段确保肿瘤样本与其配对正常样本的来源一致性（如基于 SNP 指纹或基因型一致性比对），并对样本间交叉污染设定可接受上限及判定规则。

问题 3、测序数据质控考虑及三代测序关注点？

申请人应结合样本类型、检测平台、捕获方案及后续分析目的，建立相应的测序数据质量控制标准，明确各项质控指标的判定阈值、不合格判定标准及相应处置原则。相关质控考虑应能够支持体细胞变异识别及候选新生抗原筛选分析的准确性和稳定性。如采用 WES 开展体细胞变异检测，应分别建立肿瘤样本与配对正常对照样本的质量控制标准。

测序深度应结合检测限、预期变异基因频率范围、肿瘤纯度、样本质量、捕获效率及分析流程性能合理设定。为兼顾低频体细胞变异检出与胚系背景过滤，肿瘤样本与配对对照样本可根据各自检测目的，通常采用不同的测序深度设计。对于肿瘤样本 WES 数据，申请人应结合检测限、确保相应测序深度能够满足低频体细胞变异检出及候选新生抗原筛选需求；对于配对外周血或正常组织对照样本，亦应建立与分析目的相适应的测序质量标准，以降低胚系变异漏检、背景变异过滤不充分或体细胞变异误判的风险。对于采用 WES 开展低频体细胞变异筛选的，可结合产品技术路线，将肿瘤

221 样本平均有效测序深度不低于 500×、配对正常对照样本不低
222 于 250×作为参考，具体阈值应结合预期检测限及方法学验证
223 结果确定。除测序深度和碱基质量外，申请人还应对目标区
224 域覆盖率、有效覆盖深度分布、覆盖均一性、捕获效率、重
225 复率、比对率、污染评估及样本间交叉污染控制等指标制定
226 质量要求，并说明其与低频变异识别稳定性、突变检出能力
227 及后续候选新生抗原筛选结果之间的关系。对于采用 Phred
228 质量体系的短读长平台，Q30 碱基比例可作为质量评价指标
229 之一，如不低于 80%作为参考水平；具体阈值应结合平台性
230 能及方法学验证确定。对于质量不符合标准的数据，应预先
231 明确重测、补测、重新建库、限制分析范围或终止相应分析
232 的处置原则。

233 如采用 RNA 测序开展异常剪接、融合转录本或其他转
234 录本层面的分析，申请人应根据检测技术特点建立与之相适
235 应的质量评价体系。除碱基质量外，一般还应综合考虑有效
236 读段（reads）数、比对率、转录本覆盖情况、关键位点或剪
237 接位点支持 reads 数以及事件检出重复性等指标。在上述应
238 用场景中，Q30 可作为参考指标之一，但通常不宜作为唯一
239 质量判定依据。如采用替代性或综合性指标，申请人应说明
240 其设置依据及与预期分析性能之间的关系。

241 对于三代测序(Third-Generation Sequencing, TGS)技术，
242 申请人应结合具体平台特点建立相应的质量评价体系。如结

合其读长较长的特点，以及不同平台在碱基准确性、错误模式等方面存在的差异，建立相应的质量控制策略，包括核酸完整性、有效读长及其分布、测序深度、碱基质量、以及预期用途相关的覆盖完整性等。对于融合分析，需关注融合基因的断点及上下游区域的有效覆盖；对于可变剪接或全长转录本分析，可关注转录本全长覆盖及事件支持 reads 等指标。考虑到不同平台在质量值定义、误差模式和数据特点方面可能存在差异，因此不建议仅以 Q30 等单一碱基质量指标作为主要评价依据，而应结合具体应用场景进行综合判断。

如三代测序拟用于复杂剪接、结构变异、融合事件或全长转录本分析，申请人应提供相应的方法学验证资料，说明其在目标应用场景下的检测能力、准确性、重复性及适用范围。鼓励申请人在临床试验期间持续积累平台运行和样本检测质量数据，为后续质控标准优化和方法稳定性评价提供依据。

问题 4、原始测序数据的质控考虑？

申请人应建立肿瘤组织及正常对照样本原始测序数据的质控与预处理流程，明确低质量数据、重复数据、接头污染数据及其他异常数据的过滤原则，并说明相关参数设置依据以及不合格数据处置方式。

原始数据预处理通常应包括低质量读段过滤、重复序列处理、接头污染去除及必要的污染评估等步骤。申请人需根

据所用平台特点建立相应的预处理要求。考虑到样本间交叉污染或物种污染会引入虚假体细胞变异，进而产生假候选新生抗原，因此应将污染评估纳入原始数据放行判定并明确可接受上限。鉴于二代测序与三代测序的误差模式不同，申请人应结合平台特点分别制定预处理策略并说明参数设置依据。

鼓励提供肿瘤组织 RNA-seq 数据，用于支持突变表达确认、异常剪接分析及候选抗原筛选；如未开展，应说明理由并提供支持性资料。

问题 5、测序机构的资质要求的一般考虑？

新生抗原产品的安全性和有效性高度依赖于测序数据，但鉴于该环节目前普遍委托第三方测序机构完成，因此申请人应对测序机构进行全面评估，加强供应商审计，并在申报材料中说明所用测序机构的资质情况。测序机构需具备与所开展检测工作相适应的质量管理能力，并提供相关资质证明。申请人需提供针对特定测序项目（如 WES、RNA-seq）的性能确认资料，说明相关检测项目的适用性、主要性能指标及质量控制情况。

如申请人自行开展测序，需建立相应的质量管理体系和项目性能确认要求，并保证测序过程、数据质控及结果记录可追溯。

（三）新生抗原筛选与鉴定

问题 1、新生抗原筛选与鉴定核心模块的一般考虑？

目前新生抗原筛选与鉴定分析流程通常包括变异检测、突变注释、人类白细胞抗原 (Human Leukocyte Antigen, HLA) 分型、表位 (亲和力) 预测、突变肽段表达分析、评分与排序等模块。申请人可结合产品技术路线和分析目的对模块的设置予以增减，但应说明其分析流程的科学性和合理性，并明确各模块的功能、输入输出及质控要求。

在新生抗原筛选与鉴定过程中，关键分析步骤可结合自动化质控水平与风险程度建立标准化人工审核流程，明确审核规则与记录要求。鼓励开展克隆性分析以识别主导突变并纳入候选抗原优先排序依据；鼓励将免疫肽组学质谱检测作为辅助筛选或软件/算法验证手段，并说明方法学验证情况。

问题 2、变异检测、突变注释以及突变肽段表达分析的一般考虑？

(1) 变异检测、突变注释方面

突变召回 (Mutation Calling) 是新生抗原预测流程的上游，其核心任务是从肿瘤与正常对照样本的测序数据中，精准识别出体细胞突变，申请人应建立规范的体细胞突变召回与过滤流程，并说明所用软件/算法的选择依据、关键参数设置及过滤策略。胚系变异过滤原则上应以患者自身配对正常对照样本 (通常为外周血) 的配对测序数据作为主要依据。公共人群频率数据库可作为辅助参考，不宜作为唯一的胚系筛选

依据，使用时应说明数据库版本及人群频率筛选阈值。

建议申请人结合检测目的和样本特点，采用多软件/算法交叉分析或其他等效策略提高突变召回的准确性及一致性，并说明结果整合规则。如采用单一软件/算法或单一路径进行突变召回，申请人应提供相应验证资料，证明其在既定应用场景下的适用性。

（2）突变肽段表达方面

如采用 RNA-seq 数据验证突变表达，申请人应结合检测深度、表达背景及研究数据合理设定表达阳性的判定标准。如以支持读段数作为判定指标，原则上不低于 5 条支持 reads，并结合局部有效深度、表达背景及方法学验证调整判定。对于移码/无义突变等可能产生提前终止密码子的事件，可关注无义介导的 mRNA 降解（Nonsense-Mediated mRNA Decay, NMD）对转录本表达及最终候选选择的影响。建议同时关注该读段在基因区域内的分布均匀性及是否存在显著测序链偏向性，可结合所采用的软件/算法等说明具体设定依据。若在 DNA 检测时，检测软件/算法已经过滤链偏向，申请人则可根据具体研究设置合理的判定标准。

采用正常样本对照库（Panel of Normals, PON）进行过滤时，还应关注已知致癌驱动热点突变被误过滤的风险。建议结合产品开发需求设置白名单机制，或采用其他等效策略保留具有明确生物学意义的关键热点突变，并说明相应规则和

依据。

问题 3、HLA 分型的一般考虑？

申请人应结合产品设计、样本类型及数据质量情况，建立 HLA 分型分析流程，并在申报资料中说明相关分型方法的选择依据、适用范围、关键参数设置、结果判定规则及相应质控要求。HLA 分型的分辨率和准确性应能够满足支持后续候选新生抗原筛选和表位预测的需要。

在样本质量和数据条件满足要求的情况下，可基于患者自身 WGS/WES 数据开展 HLA 分型。鉴于单一软件/算法在不同样本和等位基因背景下可能存在局限，建议结合多软件/算法交叉验证或其他等效策略提高分型结果的稳定性，并说明软件/算法选择依据、结果整合规则及分型结果不一致时的处置原则。

对于虽具备用于变异检出的测序数据、但因数据质量或样本条件限制难以基于 WGS 数据获得可靠 HLA 分型的情形或其他特殊情形，可采用 PCR-序列特异性分型（PCR-Sequence Based Typing, PCR-SBT）等方法获得 HLA 分型结果，作为后续分析输入。申请人应说明所采用方法的分型分辨率和准确性是否满足后续表位预测要求。对于采用 PCR-SBT 等方法的情形，HLA-I 类分型通常应覆盖与肽结合槽形成密切相关的外显子 2 和外显子 3 区域，HLA-II 类分型通常应覆盖外显子 2 区域；具体检测范围和分辨率应结合所采用

的分型方法及后续分析需求确定。申请人还应评估不同分型方法及分辨率对候选抗原筛选结果的潜在影响。

HLA-I 杂合性缺失（Loss of Heterozygosity, LOH）可能影响新生抗原的呈递。因此，申请人应关注 HLA-I LOH 对抗原呈递和候选新生抗原筛选的潜在影响，并结合产品开发需要开展相应分析。LOH 结果一般不宜作为剔除候选抗原的唯一依据，可结合相关等位基因表达、候选抗原优先级排序及其他支持性证据综合判断，并明确相应的分析和决策规则。

对于 HLA-II 类抗原，鉴于当前预测方法在不同等位基因和应用场景下的准确性及验证积累仍存在一定局限，申请人可结合产品设计和研究目标开展相关预测与验证，并持续积累数据。HLA-II 相关分析如未纳入当前产品开发路径，可说明理由；如纳入，应说明所用方法（包括数据库等）及其适用性依据。

问题 4、新生抗原表位（亲和力）预测的一般考虑？

申请人应建立规范的表位预测分析流程，并说明所用软件/算法的选择依据、名称、版本、适用范围、关键参数设置及相应质控要求。原则上，表位预测应明确肽段长度范围、HLA 等位基因覆盖范围、主要预测指标及其在候选新生抗原筛选中的应用方式。如采用 IC50、%Rank 等作为 HLA-肽结合预测或排序指标，申请人应说明阈值设定依据及其在候选抗原筛选中的具体作用。

建议申请人结合产品设计和研究目的,采用多软件/算法交叉分析或其他等效策略提高表位预测结果的稳定性,并说明结果整合规则、结果不一致时的处理原则及其对候选抗原筛选结果的影响。如采用单一软件/算法或单一路径进行预测,申请人应提供相应依据,证明其在既定应用场景下的适用性。还应结合预期用途对该模块开展性能评估,包括在独立数据集上的预测能力、不同 HLA 等位基因与肽段长度下的适用性、与实验结果的一致性。

在开发部分特定瘤种时,申请人可结合临床病理理论和分子检测实践进展,开发新工具和新技术,将融合基因(如肺癌、白血病、胶质瘤、肉瘤等)、微卫星不稳定变异检测(如结直肠癌、胃癌、子宫内膜癌等)等纳入预测模块,充分发挥新生抗原药品个体化免疫治疗的潜力。

鼓励申请人结合亲和力检测、免疫肽组学或 T 细胞功能实验等研究数据,对预测结果进行支持性验证,并分析预测结果与功能验证结果之间的一致性或相关性,以作为表位预测模块可信度评估的支持依据。

问题 5、候选抗原优先排序标准的一般考虑?

申请人应建立候选抗原的优先排序规则,并在申报资料中说明各项指标的选择依据、权重设置原则及其与整体筛选逻辑的关系。目前通常将亲和力预测结果作为核心排序依据之一,并结合突变表达情况、克隆性特征、变异类型及其他

相关支持性信息进行综合评价。

对于不同产品类型、不同 HLA 等位基因或不同预测软件/算法，申请人可结合研究基础采用差异化排序策略，但需提供相应依据，并说明阈值设定依据及其与排序结果的关系。

申请人还应建立针对候选序列潜在安全性风险的负面筛选策略。需将候选序列与已知毒素、自身抗原等相关数据库进行比对过滤，并说明所用数据库版本、更新时间、筛选规则及结果应用方式。对于经比对评估存在较高风险的候选序列，需说明剔除或保留的处置依据。

问题 6、多表位串联产品的序列设计的一般考虑？

对于将多个候选表位串联表达或连接的产品（如编码多表位串联体的核酸类产品、长肽串联体等），申请人应说明表位的排列顺序、连接序列（linker）的设计及其依据。

申请人应对串联设计在连接区产生的非预期人工表位开展预测与评估，包括其与人类正常蛋白质组序列的同源性、与已知自身抗原的相似性及潜在交叉反应风险，并说明评估方法、所用数据库版本及结果的处置方式。同时说明串联设计对目标表位加工与呈递效率的潜在影响及其评估方式。鼓励结合免疫肽组学或功能验证数据，对关键目标表位能否被有效加工呈递提供支持性证据。

串联序列设计原则（如排列顺序或连接序列等）确定后应予以锁定，如发生变更，需开展变更前后的可比性评估。

（四）软件/算法验证及性能评估

问题 1、对于使用公开软件/算法的一般考虑？

由于整个新生抗原的预测流程极为复杂且高度依赖于软件/算法的支持。申请人应说明所用软件/算法的选择依据、适用范围、版本信息、主要参数设置及更新维护情况。原则上，软件/算法性能评估应基于独立于模型训练、调参和优化过程的数据集开展，以避免在验证中高估软件/算法的可信度。

如采用公开数据集进行验证，申请人需说明该数据集的来源、构成、样本类型、适用场景及其与软件/算法训练数据的独立性，不得使用参与模型训练或调参的数据直接作为验证数据。对于存在训练集重叠或潜在数据泄漏风险的数据集，申请人需进行风险评估并说明对验证结果的影响。对于采用公开或第三方软件/算法，可能存在训练数据不可获知的情形，因此无法逐一核对训练集重叠，建议至少采用在时间或来源上与训练数据明确隔离的留出数据（如软件/算法发布之后新产生的数据）作为验证集，并就无法完全排除数据泄漏的残余风险作出说明。

鼓励申请人建立自有独立验证数据集，并结合实际应用场景，对软件/算法开展适用性验证。相关验证资料可说明数据集规模、样本类型、HLA 类型分布以及软件/算法在本产品应用场景中的性能表现及局限性。

问题 2、新生抗原预测软件/算法性能验证及生物学活性开发

的一般考虑？

新生抗原预测软件/算法的性能会影响最终分析产生的新生抗原的质量。因此，对新生抗原预测软件/算法性能的验证应当包括对每个模块性能的单独验证（单元测试），确保其独立运行的可靠性；以及对整体流程的验证（端到端测试）两个方面。此外，考虑到为每位患者的个体化产品开发专属的批放行生物学活性检测方法并不具备实操可行性。在此类场景下，产品的真实生物学活性高度依赖于新生抗原预测软件/算法性能的充分验证。

（1）预测软件/算法性能验证方面

目前新生抗原预测软件/算法的性能评估尚缺乏统一、权威的标准测试数据集，部分公开数据集在训练集与验证集划分方面存在一定局限。在此背景下，鼓励申请人建立独立验证数据集，并结合干实验、湿实验及免疫肽组学质谱技术等方式对软件/算法性能开展多维度综合评估。

干实验验证原则上应基于独立于模型训练、调参与优化过程的数据集开展，避免高估软件/算法性能；采用公开数据集时需说明其来源、构成及与训练数据的独立性，对存在训练集重叠风险的情况需进行风险评估，鼓励建立自有独立验证数据集并结合实际场景开展适用性验证。

仅有干实验数据不足以充分支持产品的药效及作用机制的确证，申请人需开展体外功能验证研究（如亲和力检测、

免疫肽组学、T 细胞活化及细胞杀伤活性研究等), 必要时可结合体内药效研究提供进一步的支持性证据。开展新生抗原特异性免疫应答验证(如酶联免疫斑点法、流式细胞术等)优先采用患者来源样本, 若采用健康人外周血单核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)进行体外共培养或刺激实验作为概念验证需说明理由、适用性及其局限性。鼓励申请人根据研究需要建立工程化细胞系(如 HLA 限制性转基因细胞系)等标准化验证工具, 以降低供者个体免疫背景差异对结果的影响, 并提高实验条件的可控性和重复性。基于少量样本或个体获得的功能验证数据, 其代表性和在外推性通常受到所覆盖 HLA 等位基因、突变类型及不同个体免疫背景等因素限制。申请人应结合验证所覆盖的等位基因与突变范围, 客观说明相关结果的代表性与适用边界, 避免过度外推。

免疫肽组学质谱技术可作为表位预测软件/算法的直接正交验证手段, 通过 MHC 免疫沉淀、肽段富集与高分辨质谱检测, 可鉴定细胞表面真实递呈的内源性肽段, 定量评估软件/算法预测的召回率与精确率, 还可发现非经典表位、翻译后修饰表位等常规软件/算法易漏检的类型; 应用该方法时需建立标准化的实验与分析流程, 严格控制肽段鉴定假发现率等关键质控指标, 确保结果可靠。质谱验证结果可与干、湿实验结果相互印证, 共同支撑软件/算法性能评估, 但受样

本可及性、检测深度等限制，通常作为重要补充手段。

（2）生物学活性开发方面

除软件/算法性能验证外，申请人还应结合产品作用机制开展产品生物学活性评价，建立能够反映产品预期生物学作用的活性检测方法，并提供相应的方法学研究资料。

新生抗原产品无论为 mRNA 或多肽类型，皮下给药后，其表达或所含的新生抗原肽会被树突状细胞摄取，经酶切、转运等一系列加工步骤生成表位短肽，与 HLA 分子结合形成复合物并递呈至细胞膜表面，作为第一信号与 T 细胞受体结合，进而特异性激活识别该新生抗原的 T 细胞；活化扩增后的 T 细胞可在患者体内识别并杀伤携带该新生抗原的肿瘤细胞。由于该免疫作用通路较长，理论上越靠近作用通路后端的评价方法，越能反映产品的真实生物学活性。原则上，建议优先建立可直接反映下游免疫机制的功能性检测方法，并说明其与候选新生抗原筛选结果及产品预期功能之间的相关性。

如因作用机制复杂性或方法学可行性限制，难以建立直接反映作用机制的单一活性检测方法，申请人可结合产品特点采用属性矩阵等策略，以替代指标（如关键目的蛋白表达量及功能域构象）结合关键理化特性进行综合评价，并说明替代指标与产品生物学活性之间的理论相关性依据，提供支持性验证数据。

（五）数据库与软件/算法变更

问题 1、数据库选择及版本管理的一般考虑？

新生抗原预测软件/算法中涉及多个数据库，而数据库的质量、规模和代表性等均会影响预测的准确性和覆盖范围。因此，申请人应明确所用数据库的名称、来源、版本信息及其用途，并评估数据库对拟定应用场景的代表性。用于支持申报的数据库版本应在分析流程建立时予以锁定，申报后如发生变更，需开展变更前后的可比性评估，进行变更影响分析，说明变更对候选抗原筛选结果的影响，并提供相应评估报告或对比研究资料。

申请人需建立数据库版本管理记录，保留版本启用、替换及更新的时间节点、决策依据、人员审批记录及版本锁定情况，保证可比性分析过程的可追溯性与数据完整性。

问题 2、软件/算法变更的一般考虑？

新生抗原预测流程的准确性和可靠性对于该类产品的成功至关重要，整个预测流程极为复杂，且高度依赖于软件/算法的支持。随着数据的积累和技术的进步，预测流程中采用的软件/算法、数据库等可能会出现版本更新。然而，传统的药学变更研究思路并不适用于软件/算法的更新升级，目前国家也尚未发布软件/算法层面变更管理的指导原则。随着计算机和 AI 技术的迅猛发展，软件/算法的更新升级可能较为普遍，因此，对该类产品相关软件/算法的变更进行科学管理

529 尤为重要。申请人应遵循“风险分级、科学评估、全程追溯”
530 原则，在产品全生命周期内建立软件/算法变更控制与管理规
531 程。

532 申请人应明确所采用的软件/算法的名称、版本号、适用
533 范围及功能模块。如发生预测软件/算法变更，可根据变更对
534 临床受试者安全性风险的影响程度，实施分级管理。临床期
535 间的变更一般可分为非实质性变更、实质性变更两类。非实
536 质性变更是指不影响核心软件/算法、不降低分析准确性且不
537 影响临床受试者安全性的变更，如软件/算法缺陷修复、界面
538 优化、非核心参数调整、数据库常规更新等。申请人应在变
539 更实施前对变更项进行充分的性能评估，确定变更是否会影响
540 生信分析流程性能及最终候选抗原的选择。实质性变更是指
541 影响核心算法、核心模块功能、关键参数设置，或可能导致
542 候选抗原列表显著变化并可能影响临床受试者安全性的
543 变更，如新软件/算法引入、新功能拓展（如在经典新生抗原
544 来源基础上加入对非经典新生抗原的检测）等。特别需要指
545 出的是，若软件/算法从仅分析点突变扩展至可分析剪切变异
546 或基因融合突变等全新预测维度，此类变更属于实质性的产
547 品功能扩充，宜按照新技术平台的标准开展验证，而非仅视
548 作常规的软件/算法迭代管理。

549 对于实质性变更，需开展全面的可比性研究，包括（1）
550 使用标准数据集回顾性地验证变更前后流程的性能差异；（2）

选取能够覆盖不同序列特征、HLA 分型及突变类型的代表性历史样本重新分析评估抗原选择差异；（3）开展前瞻实验验证，对变更后所筛选抗原的相关生物学功能及潜在安全性进行评价，包括表达、提呈、T 细胞激活和肿瘤细胞杀伤等。同时，应重点评估变更是否会导致具有明确生物学意义或已有免疫原性证据支持的重要候选新生抗原被异常遗漏或删除。对于此类情况，申请人应进一步分析产生原因，以及对候选抗原筛选结果、产品组成和预期临床性能的影响，并据此重新评估该变更的风险等级。此外，当软件/算法升级导致候选抗原识别范围明显扩大，或使此前未被选择的抗原进入最终产品候选范围时，建议申请人同步开展相应的潜在安全性风险评估，包括评估新增候选抗原与正常组织蛋白序列的同源性、分析其在正常组织中的潜在表达情况，并利用预测工具分析其与人类正常组织表位的潜在交叉反应性的风险。考虑到软件/算法变更的技术复杂性及其对产品安全性和有效性的潜在影响，鼓励申请人在开展变更前与监管机构进行沟通交流。