细胞治疗产品生产质量管理

细胞治疗产品无菌工艺模拟试验检查要点分析

Analysis of Key Points for Inspection of Aseptic Process Simulation Tests of Cell Therapy Products

康　鹰，马岩松，董　方，周一萌*

（国家药品监督管理局食品药品审核查验中心，北京 100044）

KANG Ying, MA Yansong, DONG Fang, ZHOU Yimeng*

(*Center for Food and Drug Inspection of NMPA, Beijing 100044*)

摘要：目前细胞治疗产品生产企业对无菌工艺模拟试验的认知和执行存在“不到位”的现象，部分药品生产企业在无菌工艺模拟试验中存在较大的试验设计问题。文章分析了细胞治疗产品无菌工艺模拟试验应考虑的要点，结合生产工艺、设施设备、物料、工作人员、生产环境和生产排产等因素进行最差条件评估，总结了细胞治疗产品无菌工艺模拟试验设计的实施要求，以期促进细胞治疗药品生产企业科学、合理地开展无菌工艺模拟试验，提高药品质量，从而保障患者安全。

关键词：细胞治疗药品；无菌生产；无菌工艺模拟试验；最差条件；风险评估

中图分类号：R95；TQ464.9　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2026)02-0216-06

引用：康　鹰, 马岩松, 董　方, 等. 细胞治疗产品无菌工艺模拟试验检查要点分析[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(2): 216-221. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.02.012

近年来，受益于政策的积极引导与支持，国内细胞治疗行业处于快速发展阶段。截至2025年6月，我国已有6款自体CAR-T细胞药品和1款脐带间充质干细胞药品获批上市[1]。

细胞治疗产品无法进行终端灭菌或终端除菌过滤，因此整个生产过程须无菌操作。生产过程的无菌情况将直接影响药品质量。某些有效期非常短的药物仅能保存数小时，需在制备后短期内进行回输，甚至在无菌检查完成之前就必须完成回输，因此该类药品的无菌生产控制尤为重要[2]。

无菌工艺模拟试验是一种评估药品生产活动无菌保证能力的有效方法。目前，行业内部分药品生产企业对无菌工艺模拟试验的认知和执行仍存在“不到位”现象，一些药品生产企业在无菌工艺模拟试验中存在较大的试验设计问题[3-4]。

文章通过对细胞治疗药品无菌工艺模拟试验的要点进行分析，重点讨论了试验设计和实施的相关内容，以期促进细胞治疗药品生产企业更科学、合理地开展无菌工艺模拟试验，提高药品质量，从而保障患者安全。

1　总体考量

无菌工艺模拟试验的核心在于，如何有效地模拟实际药品无菌生产的全过程，并覆盖所有无菌生产工序和操作，尤其是涉及暴露或存在暴露风险（如穿刺等）的操作工序及无菌焊接操作[5]。各细胞治疗产品的生产过程，大多涉及手工操作和/或敞口操作，以及一次性无菌管路系统的热合与焊接操作等，均是无菌工艺模拟试验时应关注的重点。此外，生产工序中的各种试剂、材料，例如培养添加物、基因转导载体、细胞冻存液配制组分等，传入关键生产区的消毒、敞口操作，以及各工序间或工序内一次性无菌耗材的对接，也是关注的重点。

2　无菌工艺模拟试验范围

无菌工艺模拟试验的范围应涵盖从初始无菌操

收稿日期：2025-06-30

作者简介：康　鹰，主管药师，从事药品GMP检查方向的研究。

通信作者：周一萌，研究员，从事药品监管科学、药品技术审评及现场核查、药品质量的研究。

作步骤到产品最终密封的全过程。即细胞治疗产品的无菌工艺模拟试验，应覆盖整个生产工艺；其他无除菌过滤或除菌过滤后需衔接其他无菌操作的工序（如培养基配制、冻存液的配制），以及涉及直接用于细胞治疗产品生产的基因修饰载体或其他特定功能材料的生产等工序，也应进行无菌工艺模拟试验。此外，细胞治疗产品生产过程中涉及的昂贵试剂或材料，若药品生产企业需对其进行分装、分次使用，还应对相应的分装及使用过程进行无菌工艺模拟试验。该试验可考虑结合产品无菌工艺模拟试验情况同步开展。

细胞治疗产品的生产往往涉及多种生产设备或多条生产线，生产企业在进行无菌工艺模拟试验时，应覆盖所有生产线和生产设备；当存在多种规格生产时，也应考虑包括不同规格的无菌工艺模拟试验[6]。

3 模拟干预

细胞治疗产品生产过程中的所有操作均应作为固有干预纳入无菌工艺模拟试验。固有干预的设计频次应多于常规操作，覆盖实际生产的最差条件。应根据实际情况，模拟不同工序步骤的转换场景，并根据操作要求模拟人员换班 / 手部消毒 / 更换手套（或套袖）的操作，模拟次数宜多于常规操作。

基于日常生产过程，应设计相应合理的纠正性干预（包含种类和频次）。例如，培养基盖掉落次数，应确保模拟试验中的干预次数或种类不少于日常生产过程中可能发生的次数或种类。此外，在纠正性干预中，不宜设计不合理的人为干预[2]。例如，生物安全柜（biological safety cabinet，BSC）重启、洁净区暖通空调系统（heating，ventilation，and air conditioning，HVAC）重启、变更物料消毒方式、将关键物料传入关键生产区等。纠正性干预应覆盖最多批次生产时（最差工况）可能增加的干预种类和频次。

3.1 最差条件分析

无菌工艺模拟试验成功的关键因素之一，在于是否模拟了实际生产情形下的最差条件[7-8]。最差条件是指在正常工况边缘的情况（如单位时间内的最多批次生产、最长暴露时间等），对此工艺条件进行挑战，以确保所有的无菌生产条件均能保证无菌性[9]然而，最差条件并非人为营造的超出允许范围的生产情形，亦不可借助无菌工艺模拟试验为不合理操作进行辩解[9]，无菌工艺模拟试验不能用以模拟显著不符合要求的操作。

细胞治疗产品生产工艺的最差条件，应依据产品的无菌生产工艺特性，通过风险评估分析来确定；而风险评估需结合自身工艺设计以及生产线的实际状况来确定。例如，生产区域内最多人数 / 人员的交汇，可能是造成微生物污染的最差条件；人员减少后工作人员的操作强度和活动范围增加，又可能成为新的最差条件；工序过程中的敞口时长及工艺的总敞口时长、生产区域内的排产管理、同时在线生产的最多批次等，都可能是最差条件。因此，最差条件是结合细胞治疗产品的无菌生产工艺、设施设备、物料、工作人员、生产环境和生产排产等各方面因素，经风险评估而确定[6]。

3.1.1 人员

细胞治疗产品的生产仍高度依赖于人工操作，在生产区域内保持合适的人员数量，是保障产品成功生产的关键因素之一。

在无菌工艺模拟试验中，应充分考虑洁净区人员的数量控制。人员应包括生产操作人员、中控检验人员、环境监测人员、质量监督人员、维修人员等，相应人员均接受相关培训并通过资质认定；人员培训内容应涵盖无菌工艺涉及的各方面，如 GMP 知识、微生物知识、无菌更衣、洁净室行为规范、无菌操作、设施设备运行、无菌工艺模拟试验方案或操作规程等。

应根据操作人员的职责，定义其参与无菌工艺模拟试验的步骤，并开展相应的培训、考核与资质认定。另外，无菌工艺模拟试验时还应考虑日常生产情形允许的交叉作业、换班、人员疲劳度、人员在洁净区内工作时长等情况[6,8,10]。

3.1.2 物料

在无菌工艺模拟试验中，应采用与生产实际一致的物料。然而，在进行模拟试验时，往往需要使用一些替代物，例如，模拟细胞培养基的模拟介质无法使用与细胞培养基完全一致的包装瓶。此时，

宜选择与细胞培养基包装材质、尺寸规格相近，开瓶方式类似且密闭性良好的耗材进行替代。值得注意的是，不可使用密闭性能不好的容器盛放相应物料的模拟物，并在生产区域内长期存放。

另外，应考虑模拟替代物对应的物料在日常生产过程中储存、传递进洁净区的清洁消毒方式。进行无菌工艺模拟试验时，还应考虑物料与耗材灭菌 / 消毒后的有效期，以模拟实际生产情况下的最差情形。例如，配制后的完全培养基保存时限、生产物料与耗材经消毒后的最长保存时限、消毒剂在区域内滞留时限、洁净服灭菌后的保持时限等[11]。

3.1.3 工艺工序

应当有效区分敞口和密闭生产工序，对每个敞口工序进行精准定义。基于系统性的风险评估，全面识别工序中的所有操作以及所使用的全部物料，明确每一种情况下所使用的物料、操作状况、敞口操作时长。同时，结合日常生产的暴露时长，评估每一个敞口工序的最差条件，进而确定模拟试验时应予以挑战的情形。通常，产品灌装环节涉及较长时间的敞口操作，且可能涉及不同规格产品的灌装，应充分考虑灌装最多剂量及最大灌装量等情况，设计相应的最差条件。

对于密闭生产工序，无菌工艺模拟应侧重于与密闭系统连接有关的操作工序，如一次性培养系统的管道焊接和管路热合。对于需要较长时间完成的密闭生产工序（如离心、培养等），可结合风险说明，缩短工序时间。对微生物生长可能带来抑制作用的生产工序（如冻存），经风险评估，可不包含在无菌工艺模拟中。

3.1.4 设施设备及工器具

在细胞治疗药品生产区域内，一些特殊的设施设备与工器具，如 BSC、CO_2 培养箱、离心机等，往往是生产区域内的污染源。在进行无菌工艺模拟试验时，应充分考虑设施设备与工器具可能对无菌生产带来的影响，如设施设备与工器具经深度清洁消毒后的最长保持时间。此外，细胞治疗产品的生产设施，往往有 B 级区通往较低级别洁净区甚至受控不分级（controlled not classified，CNC）区域的自净传递窗。这种特别的设计也可能给无菌生产带来挑战，因此进行模拟试验时也应充分考虑。

细胞治疗产品生产过程使用的设备和工器具较多，同一生产区域内可能布置多套相同的设备和工器具，需评估无菌模拟试验过程能否覆盖日常生产过程中设备和工器具的使用情况[12]。

3.1.5 生产排产

细胞治疗产品的生产存在批量小、批次多的特点。因此，在进行无菌工艺模拟试验时，应充分结合生产区域的产能设计、获批的产能情况以及实际生产排产情况，合理设计批次，最大限度地模拟实际生产情况，覆盖可能的污染情形[13]。另外，还应考虑细胞治疗产品可能存在提前或延后收获制剂的情况，以及生产过程中面临的最差排产条件，例如，同时进行的敞口工序数量最多、敞口时间最长、人员与设施设备及工器具占用程度最大，以及同时在产批次数量最多的情况。

生产企业对新药上市前 GMP 符合性检查的商业化规模开展无菌工艺模拟试验时，宜结合生产区域内的工艺验证和产能确认情况，分析生产排产时可能面临的最差条件。

3.2 模拟介质

细胞治疗产品的无菌工艺模拟试验，通常选用胰酪大豆胨液体培养基（trypticase soy broth medium，TSB）作为模拟介质。若需使用其他模拟介质，应充分评估其有效性。

由于模拟介质生产过程中会涉及各种原材料，如培养基添加物、基因转导载体、诱导分化试剂等，可能无法找到合适的模拟介质或难以找到合适的容器具盛放。在无菌工艺模拟试验中，如果直接在模拟介质中使用培养基添加物、基因转导载体等，应确认加入材料后的模拟介质不会影响培养基的促生长能力。

此外，若在产品无菌检查或生产环境监测过程中发现厌氧微生物，应增加厌氧培养基的模拟试验[5]。

3.3 模拟体积

在进行细胞治疗产品的无菌工艺模拟试验设计时，应评估模拟介质的使用体积。理论上要模拟实

际生产工艺中各工序使用物料的最大用量，尤其是涉及敞口操作工序的环节，包括起始原材料的最大投料量（如单采血、基因修饰系统等）和其他原材料的最大用量（如培养基添加物、磁珠等）。

对于涉及密闭操作的模拟工序，可通过风险评估适当减少其模拟介质用量，但需确保模拟体积可接触到所有无菌耗材的内表面（如培养袋规格应不小于最小培养体积），足以评估潜在的微生物污染。对于所有用于最终培养观察的容器 / 耗材，其模拟介质灌装体积应提供足够的顶部空间，以支持潜在的污染物生长，并便于观察确认是否有微生物生长。

3.4 培养与观察、促生长试验

在细胞治疗产品的无菌工艺模拟过程中，尽管模拟介质会随着工艺流程逐步进入下一道工序，但考虑到整个工艺持续时间较久，且全程需维持无菌生产状态，为了便于后续开展调查分析工作，在该过程中所使用的各类器具或耗材，在生产完成后均应保留适量培养基，密闭处理后随模拟物一同进行培养。培养期间，应定期观察所有培养物的生长情况，并在培养结束后逐袋、逐瓶、逐支进行检查，确认其无菌结果。

全程模拟过程中会产生大量的模拟样品，且包装规格各异。在模拟样品的转运、培养、观察过程中，应特别注意包装的完整性和密闭性，避免因人员导致包装破裂，进而影响无菌工艺模拟试验结果的判定。如在培养期间发现有密封缺陷的样品，应及时进行调查。

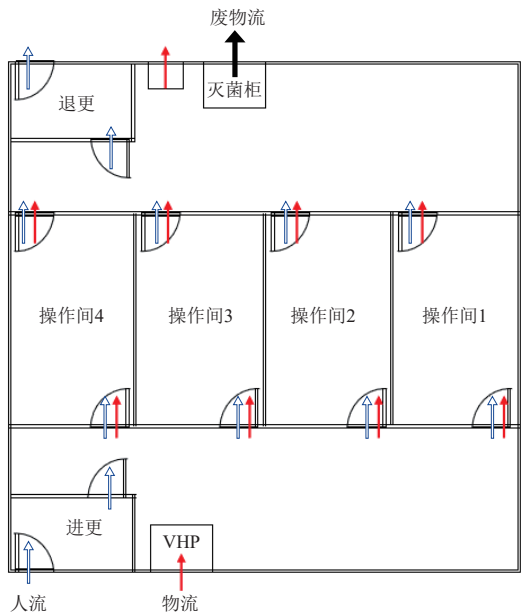
培养结束后，应对所有样品进行无菌性检查。通常，应在适当照度下进行目视观察。若包装容器会对观察造成较大影响，可更换为更容易观察的容器。培养观察记录应及时、准确、全面、可追溯。用于无菌工艺模拟试验的培养基，应选择指南推荐菌株和生产区域环境监测及无菌检查中发现的典型微生物，对其进行促生长能力试验。

3.5 模拟频率

相同品种首次进行无菌工艺模拟试验时，通常应对每条生产线的每班次进行至少连续 3 次合格的无菌工艺模拟试验。以 CAR-T 细胞药品为例，每次模拟试验时，可设计从单采血处理至产品灌装的全过程批次和 / 或多个限定工序或工序区间的阶段性批次，以完全覆盖生产线的设施设备、工器具和人员。当存在多个操作间 / 生产线时，应先结合生产工艺、批量、生产频次进行风险识别与评估。

如果相同品种在不同生产操作间生产，且每个操作间的设计和设备布局存在差异，则每个操作间无菌工艺模拟试验首次验证均需开展连续 3 次合格的模拟试验。如果相同品种在同一生产区域的不同操作间生产（一站式工作站布局），且每个操作间的设计和设备布局均相同，在进行充分风险评估后，可应用括号法（仅选择某些设计因素处在极端水平的样品，按照既定方案进行测试），选择一个处于极端水平的操作间（如进入该操作间的人 / 物流路径最远），仅对该操作间开展连续 3 次无菌工艺模拟试验首次验证，其余操作间开展 1 次即可。

图 1 展示了自体细胞治疗药品一站式工作站的布局设计示例，于同一生产区域内规划了 4 个生产操作间，每个生产操作间均可完成全部生产工序。其中，操作间 1 为人 / 物流路径的最远房间。执行时，



注：VHP 表示汽化过氧化氢。

图 1 一站式工作站布局设计

Fig.1 Layout of the One-Stop Workstation

须按最高生产频次模拟人、物流动线，以确认最差条件。

相同品种通过首次验证后，每条生产线每班次、每半年应至少进行 1 次无菌工艺模拟试验。在风险评估充分的前提下，可采用极值法或矩阵法，又或两者联用的方法开展评估和设计，以降低模拟频次。采用一站式工作站布局时，若每次仅对其中一部分操作间进行无菌工艺模拟试验，则应基于风险评估，确认是否可以交替进行模拟以覆盖所有操作间，且应确认单次模拟的操作间数量不少于同时投产批次。例如，一个生产区域有 6 个操作间，该品种最大同时投产批为 3 批，即可以每半年仅对 3 个操作间开展无菌工艺模拟试验，1 年内覆盖 6 个操作间。

在同一生产区域内生产不同品种时，若工艺步骤和生产设备相同，则可通过评估各自品种的最差条件，采用矩阵法覆盖各自品种的最差条件，合并开展无菌工艺模拟试验。例如，通过评估，品种 A 和品种 B 的最差条件如表 1 所示。在设计无菌工艺模拟试验方案时，可以合并品种 A 和品种 B 的最差条件，在一定周期内执行覆盖 2 个品种最差条件的无菌工艺模拟试验。

表 1　关于最差条件的矩阵法设计示例

Tab.1　Example of a Matrixing Design on Worst Case

生产线	工序 a（敞口）操作时长 /min	工序 b（敞口）操作时长 /min	工序 c（敞口）操作时长 /min	总焊接次数 / 次	总热合次数 / 次
品种 A	20	30	15	56	25
品种 B	25	26	18	62	22
无菌模拟方案	25	30	18	62	25

在生产频次较少的情况下（如 2 个批次产品生产间隔超过 6 个月），无菌工艺模拟试验需在下一批生产开始前完成。如果长时间不生产（如停产超过 1 年），则重新开始生产之前应进行连续 3 次无菌工艺模拟试验，并合格。另外，当生产过程发生重大变更（如厂房布局、HVAC 系统和关键工艺设备调整、敞口操作工序时长延长等）时，应结合充分风险评估，判断是否进行连续 3 次无菌工艺模拟试验，并合格。

对于培养基配制和细胞冻存液配制等工序，应基于风险评估结果，确认其是否随细胞治疗药品的无菌工艺模拟试验方案每次予以实施，或单独进行模拟试验。当单独进行模拟试验时，频率应适当，至少每半年进行 1 次；只有在不频繁生产的情况（如 2 个批次产品的生产间隔超过 6 个月但少于 1 年）下，可在生产下 1 个批次之前进行模拟[14]。同理，对于基因转导载体或激活用蛋白等直接作用于细胞治疗产品的关键原材料，其无菌生产工艺的模拟也适用以上原则。但对于其他原料，如质粒的生产和部分试剂材料的分装等，企业可基于风险评估结果确定适当的模拟频次。

3.6　无菌工艺模拟试验失败的调查

细胞治疗产品的工艺性质决定其无菌工艺模拟试验失败的概率，高于传统无菌生产工艺。一旦出现模拟试验失败，企业应进行全面、彻底的调查和分析，确定可能原因，制定并实施适当的纠正措施和预防措施。

建议企业尽可能安装覆盖全生产流程或至少覆盖关键生产操作的视频监控，并对监控视频进行妥善保存，必要时方便调查。如果根本原因调查结果显示，失败与操作人员在洁净区内的行为相关，则应当取消相应操作人员的无菌操作权限，直至其完成培训并再次获得资质确认。无菌工艺模拟失败后，应隔离生产线上的所有产品，直至问题解决，并回顾前一次实施成功的无菌工艺模拟试验以后的生产情况，评估潜在的无菌风险及对所有尚未放行批次的影响[15]。

4　结语

当前，细胞治疗产品正处于快速发展阶段，然而细胞治疗产品生产企业在生产环节暴露出很多问题，其中无菌保障是重中之重。细胞治疗产品生产企业应通过对无菌生产工艺全过程进行充分的分析和风险评估，设计合理的无菌工艺模拟试验方案，并有效模拟无菌生产全过程，以证明生产全过程的无菌保障能力，为细胞治疗药品的生产提供安全保障，进而保证患者获得安全、有效的细胞治疗方案。

参考文献：

[1]　国家药品监督管理局．境内批准生产的细胞治疗产品

［EB/OL］. ［2025-04-16］. https://www. nmpa. gov. cn/datasearch/search-result. html.

［2］ 王 雪, 卢佳琪, 韦 薇, 等. 细胞治疗药品生产技术的发展与监管挑战[J]. 中国食品药品监管, 2024, (8): 4-11.

［3］ 杨敬鹏, 沈 泓, 颜若曦. 细胞治疗产品生产现场检查要点及缺陷分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2024, **37**(11): 1383-1388.

［4］ 董雪姣, 郭林丰, 郑天雷, 等. 基于免疫细胞治疗产品生产技术探讨监管检查关注要点[J]. 中国药事, 2024, **38**(3): 245-249.

［5］ 国家药品监督管理局. 无菌工艺模拟试验指南(无菌制剂)［EB/OL］. ［2025-04-16］. https://www. nmpa. gov. cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20180911170301439. html.

［6］ 颜若曦. 无菌工艺模拟试验中常见问题和检查要点分析研究[J]. 现代药物与临床, 2022, **37**(9): 2135-2141.

［7］ 毛 红. 培养基模拟灌装试验相关缺陷分析与改进建议[J]. 中国药业, 2018, **27**(18): 80-82.

［8］ 胡敬峰, 韩 莹. 无菌工艺模拟试验中存在的问题与对策[J]. 中国药事, 2019, **33**(12): 1395-1399.

［9］ Parenteral Drug Association. PDA technical report no. 22 revised process simulation for aseptically filled products［EB/OL］. https://www. pda. org/bookstore/product-detail/1180-tr-22-process-simulation-for-aseptically-2011.

［10］ 陈翠珠, 黄长发, 李 倩, 等. 人源干细胞制剂微生物污染控制及相关规范[J/OL]. 协和医学杂志, 2024. https://kns. cnki. net/kcms2/article/abstract?v=IMWkopLkOPVC0OpJ2v1lYZ89ssOp8t7AU5ZarlLdaPvz7arobRN7ClZ_JqoRfPCmti_1ov7KxQhdo4pQI-Z2nGZbZCmKtOp5RTszVNT_RSdCYZGuj3vchD58qSh56-s0Vcp73b0AcGJws4t8UBfabCWS0vt2PNDGU2hmfhnNCCsjvCg1nc-rGA==&uniplatform=NZKPT&language=CHS.

［11］ 周 昀. 生物药无菌工艺实践总结[J]. 流程工业, 2023, (12): 56-59.

［12］ 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心. 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心关于发布《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》的通告［EB/OL］. ［2022-10-28］. https://www. cfdi. org. cn/cfdi/resource/news/14938. html.

［13］ 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心. 关于发布《细胞治疗产品生产检查指南》的通告［EB/OL］. ［2025-01-13］. https://www. cfdi. org. cn/cfdi/resource/news/16292. html.

［14］ Pharmaceutical Inspection Convention, Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme. PE 009-17 (annexes) annex 2A manufacture of advanced therapy medicinal products for human use［EB/OL］. https://picscheme. org/docview/8881.

［15］ European Commission. Eudralex volume 4 annex 1 manufacture of sterile medicinal products［EB/OL］. https://health. ec. europa. eu/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_en.