



大肠杆菌 O157:H7 噬菌体鸡尾酒喷雾干燥微囊粉剂的制备及其应用

李瑾¹, 王瑜欣¹, 王许航¹, 李静¹, 付开来¹, 戴建君^{1,3}, 汤芳^{1*}, 席静^{2*}

1 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

2 广州海关技术中心, 广东 广州 510623

3 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009

李瑾, 王瑜欣, 王许航, 李静, 付开来, 戴建君, 汤芳, 席静. 大肠杆菌 O157:H7 噬菌体鸡尾酒喷雾干燥微囊粉剂的制备及其应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3203-3218.

LI Jin, WANG Yuxin, WANG Xuhang, LI Jing, FU Kailai, DAI Jianjun, TANG Fang, XI Jing. Preparation and application of *Escherichia coli* O157:H7 phage cocktail spray drying microcapsule[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3203-3218.

摘要:【目的】提高噬菌体在常温环境下的保存稳定性, 解决噬菌体鸡尾酒在体内失活的问题, 为噬菌体对肠道疾病的治疗提供参考依据。【方法】本研究采用喷雾干燥技术制备噬菌体鸡尾酒微球粉末, 通过单因素试验和正交试验确定最佳制备条件, 并对其特性进行研究, 比较其与游离噬菌体在常温环境和体内环境的稳定性差异, 并通过口服给药的方式对大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157:H7 导致的肠道疾病进行治疗。【结果】本研究以海藻糖和亮氨酸组合为保护剂制备了一种具有热稳定性的噬菌体鸡尾酒微球粉末, 试验结果显示, 海藻糖和亮氨酸质量比为 9:1 时, 设置进料速度为 7.5 mL/min、海藻糖浓度为 2%、入口温度为 130 °C、噬菌体鸡尾酒悬液与保护剂溶液体积比为 1:50, 噬菌体滴度损失最小, 仅下降(0.623±0.235) log₁₀ PFU/g。其在常温条件下保存 6 个月, 噬菌体鸡尾酒滴度损失(0.862±0.082) log₁₀ PFU/g, 较游离噬菌体具有更长的保存稳定性, 且其于体内环境的稳定性和治疗效果均优于游离噬菌体鸡尾酒。【结论】采用喷雾干燥法配合合适的保护剂配方可制得具有生物活性和热稳定性的噬菌体鸡尾酒微球粉末, 延长其保质期, 便于常温条件下的保存运输, 使噬菌体制剂从实验室方向转化为工业方向的规模化生产提供参考依据。且噬菌体微球粉末清除肠道内大肠杆菌的能力更强、速度更快, 是一种具有体内治疗发展潜力的口服给药剂型。

关键词: 噬菌体鸡尾酒; 喷雾干燥微球粉末; 大肠杆菌 O157:H7; 噬菌体治疗; 体内

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC1605400); 国家自然科学基金(32172858)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605400) and the National Natural Science Foundation of China (32172858).

*Corresponding authors. TANG Fang, Tel: +86-25-84396517, E-mail: tfalice@126.com;

XI Jing, Tel: +86-20-38291657, E-mail: xij@iqtcnet.cn

Received: 2022-12-04; Accepted: 2023-02-27; Published online: 2023-03-15

Preparation and application of *Escherichia coli* O157:H7 phage cocktail spray drying microcapsule

LI Jin¹, WANG Yuxin¹, WANG Xuhang¹, LI Jing¹, FU Kailai¹, DAI Jianjun^{1,3}, TANG Fang^{1*}, XI Jing^{2*}

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 Guangzhou Customs District Technology Center, Guangzhou 510623, Guangdong, China

3 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To improve the storage stability of the phage at room temperature, solve the problem of inactivation of phage cocktail *in vivo*, and provide references for the effective treatment of gastrointestinal diseases by phages. **[Methods]** This study prepared phage cocktail microsphere powder by spray drying technology. The optimal preparation conditions were determined by single factor experiment and orthogonal experiment. The characteristics were studied, and the stability of the phage was compared with that of free phage at room temperature and *in vivo* was compared. Gastrointestinal diseases caused by *Escherichia coli* O157:H7 were treated by oral administration. **[Results]** In this study, a combination of trehalose and leucine was used to prepare a thermally stable phage cocktail microsphere powder. The results showed that the optimal mass ratio of trehalose and leucine was 9:1, the optimal speed of wriggling pump was 7.5 mL/min, the optimal trehalose concentration was 2%, the optimal inlet temperature was 130 °C, and the optimal volume ratio of the phage cocktail suspension to the protectant solution was 1:50. Under the optimal conditions above, the titer loss was the lowest, only decreased by $(0.623 \pm 0.235) \log_{10}$ PFU/g. After 6 months of storage at room temperature, the titer loss of the phage cocktail microsphere powder was only $(0.862 \pm 0.082) \log_{10}$ PFU/g, which had longer storage stability than the free phage, and the stability *in vivo* and therapeutic effect were much better than the free phage. **[Conclusion]** Studies have shown that the spray drying method and suitable protective agent formula can be used to prepare phage cocktail dry powder with biological activity and thermal stability, which can extend retention time, facilitating the transportation under normal temperature conditions. This provides references for the transformation of phage preparations from the laboratory to the industrial large-scale production. Moreover, the phage microsphere powder shows an excellent ability to remove *E. coli* in the intestinal tract with a high speed, indicating its potential as an orally therapeutic agent *in vivo*.

Keywords: phage cocktail; spray-dried microsphere powder; *Escherichia coli* O157:H7; phage therapy; *in vivo*

噬菌体治疗是一种古老的杀灭细菌病原体的方法，近年来由于抗生素耐药问题的快速发展而被重新考虑，其具有自我复制与增殖、特

异性强、安全无残留、来源丰富等许多优点。有报道表明噬菌体鸡尾酒的体外实验已成功减少或消除了大肠杆菌(*Escherichia coli*)的数量^[1],

通过在食物、动物皮肤或感染部位表面应用较高滴度的特异性噬菌体组合来减少其中的细菌数量^[2-4]。但针对体内实验而言,由于胃肠道的不利环境影响了噬菌体的生存和增殖,也可能大肠杆菌 O157:H7 进入了某些噬菌体难以到达的位置,导致其存在一定的难度。为了克服和减少这些问题对噬菌体治疗产生的影响,应该尝试一种能够替代游离噬菌体治疗的全新噬菌体递送方法,如微胶囊^[5]。Smith 等^[6]曾使用 CaCO₃ 缓冲液悬浮噬菌体进行灌服,减少了体内强酸性环境对噬菌体的影响,从而起到保护作用。利用某些化合物将噬菌体包裹形成微囊化的噬菌体微粒,这在某种程度上提高了噬菌体在体内的生存活性,也改善和优化了噬菌体的给药途径。

喷雾干燥技术是将溶液、乳状液或悬浮液通过高温气体介质,经过雾化喷嘴在一步内将其转化为干燥粉末的过程,为微囊化技术的物理方法之一^[7]。其最先应用于乳制品和食品加工行业,随后越来越广泛地应用于生物大分子和生物制药的加工,是一项十分成熟且有效的干燥技术^[8],具有显著的经济和加工优势^[9]。喷雾干燥器主要由干燥室、喷嘴(雾化器)、气泵(吸气器)和收集旋风分离管 4 个主要部件构成,蠕动泵将溶解有固体的溶液或悬浮液泵入输料管内,其被雾化成极细的液滴,与外界经过滤加热的空气接触,溶剂迅速蒸发,每个液滴被分散成一个微粒,最终冷却形成微球粉末。喷雾干燥法快速便捷、操作简单,具有较高的工艺产量和相对较低的成本,是一种快速、连续和可扩展的过程,可用于生产能够控制颗粒粒度、分布和密度以及表面组成、粗糙度和流动性的粉末^[10],适合各种治疗用途微粒的生产^[11]。

肠出血性大肠杆菌(enterohaemorrhagic *E. coli*,

EHEC)是一种世界性的人畜共患病病原体,大肠杆菌 O157:H7 是其中一种食源性病原体,可引起出血性结肠炎和(危及生命的)溶血性尿毒症综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)^[12]。在抗生素的广泛使用过程中人们发现,磷霉素、卡那霉素及喹诺酮类抗菌剂在一定条件下会诱导志贺毒素的产生,它们不仅会影响致病菌在肠道中的发展,还扰乱了正常的微生物区系平衡^[13]。O157:H7 特异性噬菌体可以作为预防大肠杆菌 O157:H7 感染或治疗大肠杆菌 O157:H7 的理想候选者^[14],因此迫切需要生产安全有效的噬菌体药物制剂来治疗细菌性疾病患者。本研究通过喷雾干燥法制备固体干粉形式的噬菌体鸡尾酒微囊粉剂,由此得到的微囊粉剂具有良好的储存期,使噬菌体能够抵御恶劣的胃肠道环境并保持长久的活性,为优化噬菌体的给药剂型及其体内治疗效果提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与噬菌体

菌株为实验室保存的 O157:H7 菌株 (NC_002695.2),由江苏省疾控中心惠赠。噬菌体为实验室分离保存的肌尾科噬菌体 PSD2 001、PSD2 002 和长尾科噬菌体 PNJ1 902,全基因组序列已上传至 NCBI SRA,序列号分别为 PNJ1 902 (SRR18692579)、PSD2 001 (SRR18692585)、PSD2 002 (SRR18692629)。微胶囊为运用喷雾干燥试验方法制备的噬菌体鸡尾酒喷雾干燥微囊粉剂。

1.1.2 实验动物及饲养

雌性 ICR 小鼠[体重(20±2) g, 4-5 周龄],购自扬州大学比较医学中心。所有小鼠均饲养于南京农业大学实验动物中心的无病原体鼠笼

内。动物实验通过南京农业大学实验动物伦理审查委员会(PTA2019024)审批,符合动物伦理和福利要求。

1.1.3 试剂和仪器

海藻糖(D-trehalose anhydrate)、壳聚糖(chitosan, 脱乙酰度 $\geq 95\%$)、乳糖(α -lactose monohydrate)、蔗糖(sucrose)、亮氨酸(leucine)、甘氨酸(glycine)、氯化钠(NaCl)、脱脂奶粉(skim milk powder)、链霉素(streptomycin)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、胰蛋白胨(tryptone)、酵母提取物(yeast extract)、琼脂粉(agar)、SM 缓冲液(Tris·HCl 1 mol/L pH 7.5 50 mL; NaCl 5.8 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g; 明胶 0.1 g; ddH₂O 定容至 1 000 mL)、模拟胃液(胃蛋白酶 3.2 g; NaCl 2 g; 去离子水定容至 1 000 mL; pH 2.0)、模拟胆盐(胆汁提取物 1 g; 去离子水 100 mL)、模拟肠液(胰蛋白酶 10 g; KH_2PO_4 6.8 g; 去离子水定容至 1 000 mL; pH 6.8)等。TB Green 染料法定量试剂盒购自 TaKaRa、炎症因子 ELISA 检测试剂盒(IL-1 β 、TNF- α)购自上海酶联生物科技有限公司、粪便基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。

超净工作台, 苏净安泰 SW-CJ-2FD; 喷雾干燥机, 上海继谱电子科技有限公司; 磁力搅拌器, Thermo Scientific; 兽用全自动血细胞分析仪, Mindray BC-5000Vet; 荧光定量 PCR 仪, Thermo Fisher; 酶标仪, TECAN NanoQuant Plate TM; 光学显微镜, Leica DM500。

1.2 噬菌体喷雾干燥微囊粉剂的制备

选择海藻糖、壳聚糖、乳糖、蔗糖、亮氨酸、甘氨酸、脱脂奶粉等一些糖类及氨基酸类物质作为壁材保护剂, 使用一种或几种保护剂组合按照合适的浓度配制溶液。称取适量保护剂, 与去离子水混合, 用磁力搅拌器搅拌至充分溶解, 将提前制备好的 PSD2 001、PSD2 002

和 PNJ1 902 噬菌体鸡尾酒悬液与保护剂溶液按照一定比例混合备用。调节实验室喷雾干燥器(试验前已清洗烘干并完成消毒)的风机大小、入口温度、蠕动泵速度、通针频率至标准水平, 对噬菌体鸡尾酒进行喷雾干燥, 收集粉末后进行噬菌体活性测定, 对比噬菌体滴度损失和粉末形态, 保存状态等因素以确定最佳保护剂进行后续实验。

1.3 噬菌体喷雾干燥微囊粉剂制备条件的探索

影响噬菌体喷雾干燥微球粉末包封效率的因素主要包括: 保护剂浓度、入口温度、蠕动泵速度、噬菌体鸡尾酒与保护剂溶液的比例等。为了探究这些因素对微囊粉剂中噬菌体鸡尾酒活性的影响, 在保持其他 3 个因素恒定的前提下, 设置单因素试验测试各变量因素在喷雾干燥过程中对噬菌体鸡尾酒微囊粉剂滴度的影响。

在单因素试验的基础上, 以噬菌体鸡尾酒微囊粉剂保护作用最大化为目的, 设计正交试验筛选制备噬菌体微囊粉剂的最佳工艺条件。蠕动泵速度、保护剂浓度、入口温度、噬菌体鸡尾酒与保护剂溶液体积比 4 个因素分别设置为因素 A、因素 B、因素 C 和因素 D。因素 A 取 4 个水平组别(设定为 3.0、4.5、6.0、7.5 mL/min); 因素 B 取 5 个水平组别(设定为 1%、2%、3%、4%和 5%); 因素 C 取 5 个水平组别(设定为 110、130、150、170、190 °C); 因素 D 取 5 个水平组别(设定为 1:100、1:50、1:25、1:10 和 1:5)。根据以上组别设计五因素正交表, 各因素间不存在交互和干扰作用, 本试验的所有因素水平根据自身预实验经验和参考文献设定, 使用 GraphPad 软件进行分析, 试验重复 3 次。

1.4 噬菌体喷雾干燥微囊粉剂的特性研究

将制得的喷雾干燥微囊粉剂取适量置于载玻片上, 使其均匀分散, 使用光学显微镜观察,

测量并计算噬菌体微囊的平均粒径和粒度的区间范围。

随机抽取同一批次、在完全相同条件下制备的噬菌体鸡尾酒微囊粉剂, 每份分别精确称取 0.1 g, 测定其均一性和含水率。将同批次制备完成的微囊粉剂平均分为 4 份, 用西林瓶分装并加铝箔盖密封标记后, 分别放置于-20、4、20、37 °C 的恒温环境中, 然后平均隔 10、30、45、60 d 检测其噬菌体活性, 评估噬菌体鸡尾酒微囊粉剂在不同温度条件下的稳定性和保存情况。

1.5 噬菌体喷雾干燥微囊粉剂的体外模拟试验

为了探究喷雾干燥后的噬菌体微囊粉剂对体内胃酸、胆汁酸盐和肠液的耐受性, 将噬菌体鸡尾酒悬液样品和喷雾干燥微囊粉剂样品暴露于模拟胃液(pH 2.0)、模拟胆盐(浓度为 1%)和模拟肠液(pH 6.8)中, 分别测定不同时间点溶液中的噬菌体效价^[15]。

1.6 噬菌体喷雾干燥微囊粉剂体内治疗效果评估

将所有小鼠随机分为游离噬菌体组、噬菌体微囊粉剂组和空白对照组 3 组, 每组 10 只。在动物实验之前 2 d, 给予全部小鼠饲喂 5 g/L 链霉素溶液 24 h, 后禁食禁水 24 h, 灌服浓度为 5% 的 NaHCO₃ 溶液, 起到中和胃酸的作用。20 min 后, 给空白对照组的小鼠灌服磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS), 其余 2 组小鼠灌服大肠杆菌 O157:H7, 浓度为 10⁹ CFU/mL。

灌服菌液 8 h 后, 给予游离噬菌体组小鼠噬菌体鸡尾酒悬液, 给予微囊组小鼠微囊化噬菌体, 空白对照组灌服同样剂量的 PBS。给药后 1 周内仔细观察并记录小鼠灌胃后每日的临床表现、精神状态和死亡情况, 定时称量各组小鼠体重并做相关记录。每日定时收集各组小

鼠粪便, 检测和评估粪便中大肠杆菌 O157:H7 的浓度变化和噬菌体鸡尾酒的滴度变化, 根据表 1 中所示编码 O157 和 H7 抗原的基因(*fliC*、*rfbE*)通过荧光定量 PCR 方法定量检测粪便中大肠杆菌 O157:H7 的数量。每日对小鼠进行眼球采血, 分别用于血细胞分析和 IL-1 β 、TNF- α 两种炎性因子的检测。此外, 在试验后第 3 天剖杀各组部分小鼠, 将小肠组织样品切片进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色后用光学显微镜进行观察。

试验结果以 3 次试验的平均值计算, 使用 GraphPad 软件进行分析, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 保护剂的筛选

试验结果如图 1 所示, 海藻糖与亮氨酸的组合保护效果最佳, 噬菌体滴度损失最小, 为 (0.740 \pm 0.098) log₁₀ PFU/g。海藻糖与乳糖、壳聚糖、蔗糖相比, 具有显著的保护效果($P < 0.05$), 其与亮氨酸的组合较海藻糖本身对噬菌体鸡尾酒的保护效果更好, 且制得的微囊粉剂具有更好的分散性, 故将海藻糖和亮氨酸作为后续喷雾干燥试验的保护剂。此外, 如图 2 所示, 随着海藻糖占比的上升, 噬菌体的滴度损失逐渐降低, 微囊粉剂对噬菌体的保护效果越来越好, 当海藻糖含量为 90% 时, 噬菌体鸡尾酒的滴度损失最小, 为 (0.855 \pm 0.079) log₁₀ PFU/g, 确定

表 1 大肠杆菌 O157:H7 特异性基因检测引物
Table 1 Primers for detection of *Escherichia coli* O157:H7

Primers	Primer sequence (5'→3')	Gene
O157-F	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	<i>rfbE</i>
O157-R	CATTGGCATCGTGTGGACAG	<i>rfbE</i>
H7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	<i>fliC</i>
H7-R	CAACTGTGACTTTATCGCCATTCC	<i>fliC</i>

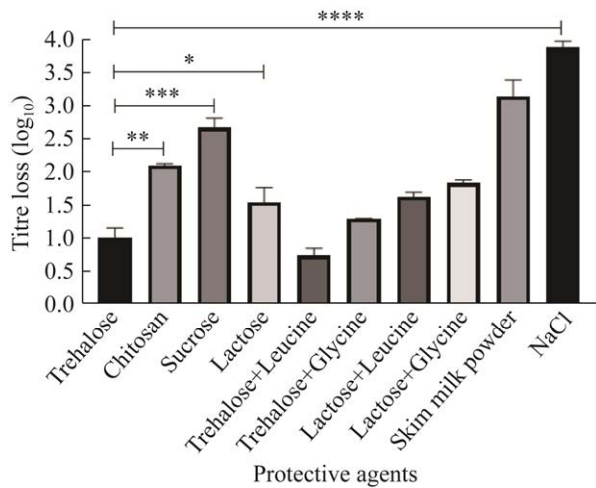


图 1 不同保护剂对喷雾干燥噬菌体滴度的影响
Figure 1 Effects of different protective agents on spray-dried phage titers. *: Significant difference between the trehalose group and the lactose group ($P<0.05$); **: Significant difference between the trehalose group and the chitosan group ($P<0.01$); ***: Very significant difference between the trehalose group and the sucrose group ($P<0.001$); ****: Very significant difference between the trehalose group and the sodium chloride group ($P<0.0001$).

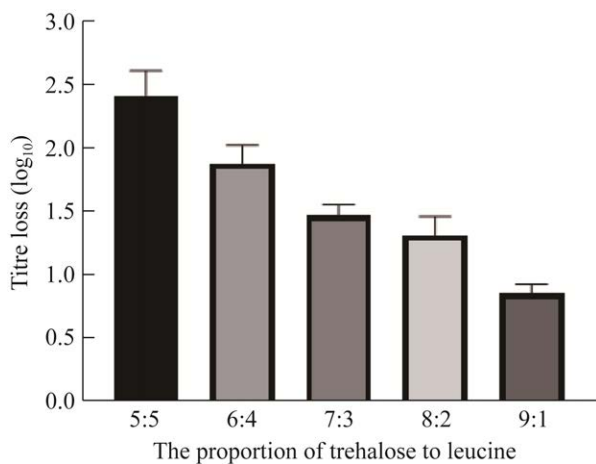


图 2 海藻糖与亮氨酸的比例对喷雾干燥噬菌体滴度的影响
Figure 2 Effect of the ratio of trehalose to leucine on spray-dried phage titers. The standard deviation in the figure represents the degree of dispersion of a set of three data.

保护剂配方为质量分数比为 9:1 的海藻糖与亮氨酸组合。

2.2 单因素试验和正交试验

单因素试验结果如图 3 所示, 蠕动泵速度在 7.5–9.0 mL/min 时, 微囊内的噬菌体滴度损失最小, 为 (0.633 ± 0.080) log₁₀ PFU/g (图 3A)。随着保护剂溶液中海藻糖浓度的不断上升, 噬菌体滴度损失越来越大, 海藻糖浓度为 2% 时, 噬菌体活性最高, 噬菌体滴度仅下降 0.834 log₁₀ PFU/g (图 3B)。不仅如此, 其滴度损失与喷雾干燥机的入口温度呈现正相关, 入口温度越低, 对微囊内噬菌体的伤害越小, 活性越高, 入口温度为 110 °C 时对噬菌体滴度损失最小, 为 (0.630 ± 0.023) log₁₀ PFU/g (图 3C)。噬菌体鸡尾酒与保护剂溶液的体积比在 1:100 与 1:50 之间时, 噬菌体滴度损失无明显差异, 为 (0.844 ± 0.242) log₁₀ PFU/g, 体积比为 1:50 时噬菌体滴度损失最小, 下降 0.6 log₁₀ PFU/g (图 3D)。

正交试验结果如表 2 所示。由表 2 可知, 当蠕动泵速度为 7.5 mL/min、海藻糖浓度为 2%、入口温度为 130 °C、噬菌体悬液与保护剂溶液体积比为 1:50 时, 噬菌体鸡尾酒喷雾干燥微囊粉剂的滴度损失最小, 下降 (0.623 ± 0.235) log₁₀ PFU/g, 较其余各组具有最好的包封效果。

2.3 噬菌体喷雾干燥微囊粉剂的特性研究

2.3.1 微囊粉剂的粒径和形态

通过喷雾干燥方法制备的噬菌体鸡尾酒微囊粉剂形态和大小如图 4 所示, 从图 4A 中可以看出粉末质地细腻, 似面粉样, 具有较好的流动性。从图 4B 中可以看到, 在光学显微镜下粉末为表面略显粗糙的球形颗粒, 微球之间不黏连, 分散性较好, 粒度分布范围较窄, 为 3–10 μm 不等, 多集中在 5 μm。

2.3.2 喷雾干燥样品的均一性

同一批次制备的微囊粉剂均一性结果如图 5A 所示, 5 份微囊粉剂的噬菌体滴度均维持

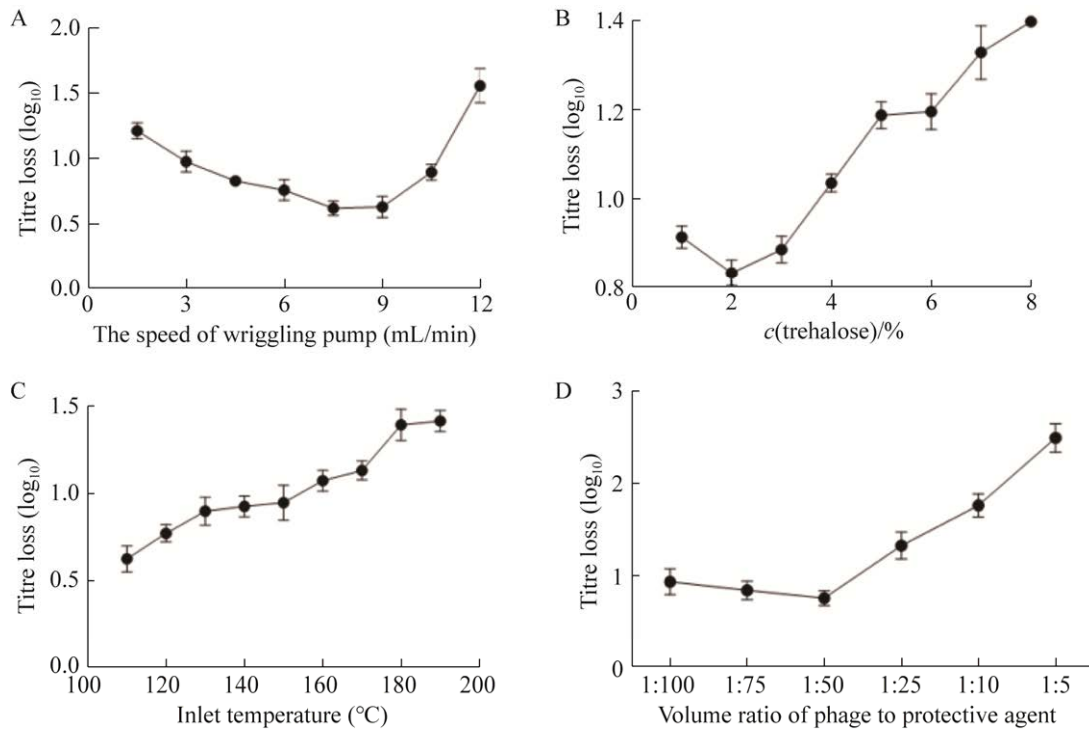


图 3 各单因素对喷雾干燥噬菌体滴度的影响

Figure 3 Effect of single factors on spray-dried phage titers. A: Effect of wriggling pump speed on spray-dried phage titers. B: Effect of trehalose concentration on spray-dried phage titers. C: Effect of inlet temperature on spray-dried phage titers. D: Effect of phage to protective agent ratio on spray-dried phage titers. The standard deviation in the figure represents the degree of dispersion of a set of three data.

在 10^7 PFU/mL, 粉末内的噬菌体活性无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明喷雾干燥方法制备的噬菌体鸡尾酒微囊粉剂均一性良好。

2.3.3 喷雾干燥样品的含水率

同一批次制备的微囊粉剂含水率结果如图 5B 所示, 3 份喷雾干燥微囊粉剂的含水率均保持在 $32.43\% \pm 2.14\%$, 组间数据无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.3.4 喷雾干燥样品的保存稳定性

图 6A 显示了喷雾干燥噬菌体微囊粉剂和游离噬菌体鸡尾酒在常温环境 (25 °C) 下的滴度变化。结果显示, 常温放置 6 个月的游离噬菌体活性大大下降, 效价损失 (2.019 ± 0.163) log₁₀ PFU/mL, 而微囊粉剂内的噬菌体滴度损失仅 (0.862 ± 0.082) log₁₀ PFU/g, 两者存在显著性差异

($P < 0.001$)。并且, 如图 6B 所示, 微囊粉剂在 -20 °C 和 4 °C 下密封储存 2 个月, 噬菌体滴度基本保持不变, 密封储存 6 个月后, -20 °C 噬菌体活性仅下降 (0.344 ± 0.020) log₁₀ PFU/g, 4 °C 噬菌体活性仅下降 (0.457 ± 0.128) log₁₀ PFU/g。微囊粉剂在 25 °C 下储存 6 个月后仍保持较高活性, 噬菌体鸡尾酒滴度损失 (0.862 ± 0.082) log₁₀ PFU/g, 下降小于 1 个数量级。此外, 在 37 °C 的恒温环境中, 喷雾干燥微囊粉剂也能保持一定的热稳定性, 储存 30 d 其滴度损失为 1.169 log₁₀ PFU/g。结果显示, 喷雾干燥噬菌体鸡尾酒微囊粉剂与游离噬菌体鸡尾酒相比在常温环境有更好的保存稳定性, 保存时间更长。在 -20 °C 和 4 °C 环境中, 微囊化噬菌体也较常温环境保存效果更好。

表 2 噬菌体鸡尾酒喷雾干燥微球制备的正交试验
Table 2 The orthogonal test for preparation of phage cocktail spray drying microspheres

No.	A (mL/min)	B (%)	C (°C)	D	Titre loss (\log_{10})
1	3.0	1	110	1:100	-1.780±0.216
2	4.5	1	110	1:100	-1.388±0.158
3	6.0	1	110	1:100	-1.550±0.127
4	7.5	1	110	1:100	-1.966±0.229
5	3.0	2	130	1:50	-1.386±0.105
6	4.5	2	130	1:50	-0.962±0.072
7	6.0	2	130	1:50	-0.821±0.162
8*	7.5	2	130	1:50	-0.623±0.235
9	3.0	3	150	1:25	-1.616±0.170
10	4.5	3	150	1:25	-1.318±0.026
11	6.0	3	150	1:25	-0.956±0.058
12	7.5	3	150	1:25	-0.868±0.139
13	3.0	4	170	1:10	-2.564±0.315
14	4.5	4	170	1:10	-2.290±0.201
15	6.0	4	170	1:10	-2.112±0.084
16	7.5	4	170	1:10	-1.742±0.164
17	3.0	5	190	1:5	-2.936±0.159
18	4.5	5	190	1:5	-2.734±0.238
19	6.0	5	190	1:5	-2.283±0.113
20	7.5	5	190	1:5	-2.159±0.096

A: The speed of wriggling pump; B: The concentration of trehalose; C: Inlet temperature; D: Volume ratio of phage to protective agent; Titre loss: Titer loss of phage cocktail microcapsules; *: Parameters with minimal titer loss.

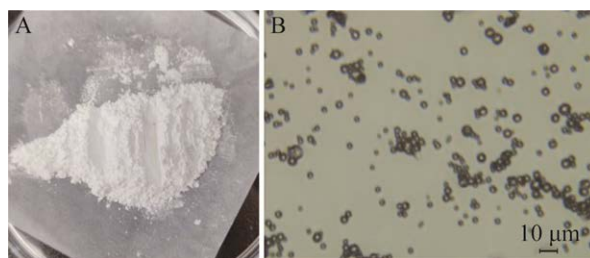


图 4 喷雾干燥微囊粉剂图像

Figure 4 Images of spray-dried phage microsphere powder. A: Phage microsphere powder in visual observation. B: Phage microsphere powder under optical microscope.

2.4 噬菌体喷雾干燥微囊粉剂的体外模拟试验

图 7A–7F 分别显示了游离噬菌体鸡尾酒和喷雾干燥噬菌体微球在模拟胃液、模拟胆盐和模拟肠液中的稳定性。如图 7A 所示，游离噬菌体在模拟胃液中存在 30 min 效价即损失 (2.086 ± 0.403) \log_{10} PFU/mL, 60 min 噬菌体则全部失活，表明游离的噬菌体对于酸性环境十分敏感。而微囊粉剂内部噬菌体对于模拟胃液则有一定的抵抗力，孵育 60 min 后滴度损失 (0.656 ± 0.143) \log_{10} PFU/g, 孵育 120 min 后滴度损失 (0.750 ± 0.270) \log_{10} PFU/g (图 7B), 结果

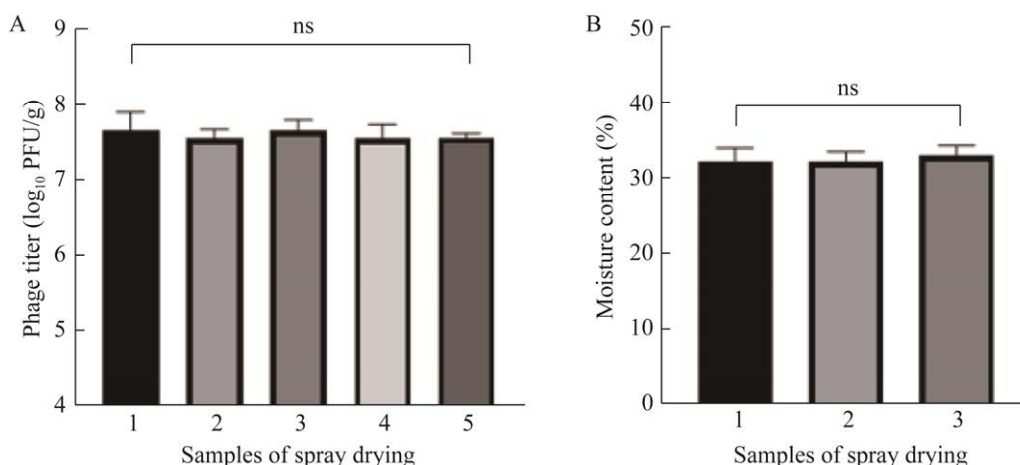


图 5 喷雾干燥噬菌体样品性质

Figure 5 Characteristics of spray-dried phage samples. A: Homogeneity of spray-dried phage samples. B: Moisture content of spray-dried phage samples. ns: No significant difference between two groups of data ($P > 0.05$).

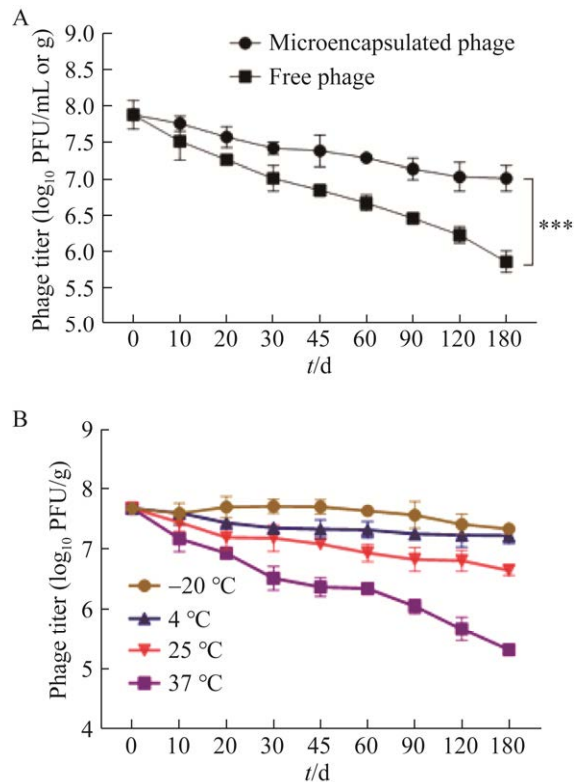


图 6 噬菌体的保存稳定性

Figure 6 Stability of phage during storage. A: Stability of free and spray-dried phage during storage. B: Storage stability of spray-dried phage at different temperatures. ***: No significant difference between the 2 groups of data ($P < 0.001$).

表明喷雾干燥噬菌体微球较游离噬菌体在 pH 为 2 的胃液环境中活性更为稳定。

游离噬菌体和喷雾干燥噬菌体对模拟胆盐的耐受性如图 7C 所示, 随着游离噬菌体模拟胆盐溶液中孵育时间的延长, 其滴度从 10^7 PFU/mL 逐渐下降至 10^6 PFU/mL; 而图 7D 显示, 噬菌体鸡尾酒微囊粉剂在前 60 min 内效价变化不明显, 直至孵育到 180 min, 噬菌体滴度仅损失 (0.296 ± 0.027) log₁₀ PFU/g。结果表明, 相比于模拟胃液, 游离和微囊化的噬菌体在模拟胆盐中具有更好的稳定性, 且胆盐不是喷雾干燥噬菌体鸡尾酒在胃肠道内存活的障碍。

两者在模拟肠液(simulated intestinal fluid, SIF)中的稳定性如下图所示, 从图 7E 中可以看出, 游离化的噬菌体鸡尾酒在 pH 为 6.8 的模拟肠液中效价基本保持稳定, 噬菌体活性较高。图 7F 显示喷雾干燥后的噬菌体与游离噬菌体类似, 在肠液中孵育 180 min 后, 效价基本不变, 维持在 10^7 PFU/mL, 表明噬菌体鸡尾酒对模拟肠液具有良好的耐受性, 可以在其中持续稳定存在。

2.5 噬菌体鸡尾酒喷雾干燥微球体内治疗效果评估

2.5.1 小鼠死亡情况及体重变化

小鼠存活曲线如图 8A 所示, 阳性对照组小鼠在 3 d 内死亡 5 只, 而阴性对照组小鼠状态良好。游离噬菌体治疗组在第 1 天死亡 2 只, 第 2 天死亡 1 只。喷雾干燥噬菌体治疗组仅在第 1 天死亡 1 只。动物试验结果表明, 喷雾干燥噬菌体微囊粉剂组与阳性对照组和游离噬菌体治疗组相比死亡率较低。图 8B 显示了 O157:H7 感染后游离噬菌体组、微囊化噬菌体组以及 PBS 组 3 组小鼠 1 周内的体重变化情况。游离噬菌体组和微囊化噬菌体组的小鼠体重起初降低, 后逐渐回升, 且微囊化噬菌体组小鼠体重回升较快, 而阴性对照组体重则持续不断升高, 直至 (25.93 ± 0.37) g, 微囊化噬菌体组与游离噬菌体组和阴性对照组均有显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.5.2 血液中中性粒细胞及淋巴细胞的变化

图 9A–9D 是 3 组小鼠给药后 1 周内血液中中性粒细胞及淋巴细胞的变化情况。如图 9A 所示, 阴性对照组中性粒细胞占比在 12.13% 上下轻微浮动, 微囊组和游离噬菌体组第 1 天迅速上升, 分别达到 $45.93\% \pm 2.17\%$ 和 $28.53\% \pm 9.77\%$, 后逐渐下降, 微囊组 7 d 后降至与阴性组同一水平, 与游离组存在显著性差异 ($P < 0.01$)。淋巴细胞的

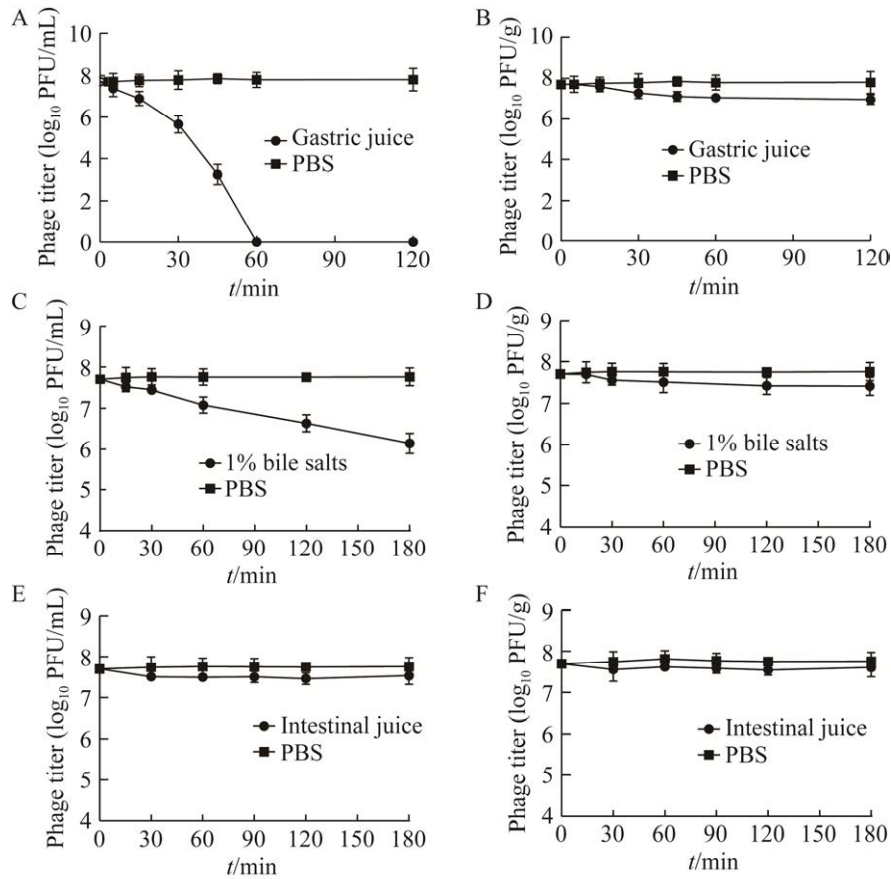


图 7 噬菌体在模拟体液中的稳定性

Figure 7 Stability of phage in simulated body fluid. A: The stability of free phage cocktail in simulated gastric fluid (SGF). B: The stability of spray-dried phage cocktail microsphere powder in SGF. C: The stability of free phage cocktail in bile salts. D: The stability of spray-dried phage cocktail microsphere powder in bile salts. E: The stability of free phage cocktail in SIF. F: The stability of spray-dried phage cocktail microsphere powder in SIF. The standard deviation in the figure represents the degree of dispersion of a set of three data.

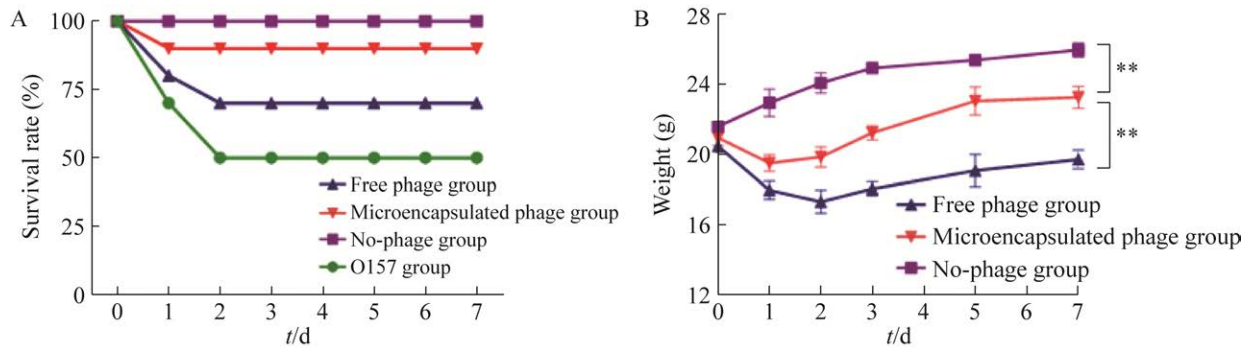


图 8 小鼠存活曲线及体重变化

Figure 8 Survival curve and weight change of mice. A: Survival curve of mice. B: Weight change of mice. **: Significant differences between the microencapsulated phage group and the free phage group and the negative control group ($P < 0.01$).

变化结果如图 9B 显示, 阴性对照组淋巴细胞在 1–7 d 内占比基本维持在 $82.87\% \pm 7.50\%$, 微囊组和游离噬菌体组第 1 天均下降至 60% 以下, 后数值逐步回升。但微囊组较游离噬菌体组数值上升较快, 证明喷雾干燥噬菌体鸡尾酒微囊粉剂组的治疗效果更好。

2.5.3 血液中炎症因子的变化

图 9C、9D 分别表示了小鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的变化情况。从图 9C 中可以看出, 游离噬菌体组和噬菌体微囊粉剂组的小鼠起初 TNF- α 数值均升高, 但游离噬菌体组数值上升幅度更大, 从第 2 天开始均有明显回落, 但微囊组 TNF- α 下降速度更快, 与游离噬菌体组有显著性差异 ($P < 0.01$), 之后在第 5–7 天内微囊组

已基本恢复至正常水平, 数值与阴性对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。

IL-1 β 的变化情况与 TNF- α 类似, 如图 9D 所示, 游离噬菌体组起初上升幅度更大, 第 1 天从 (80.00 ± 5.22) pg/mL 快速上升至 (158.50 ± 13.92) pg/mL, 后期虽逐渐下降, 但仍高于微囊组和阴性对照组, 与游离噬菌体组有显著性差异 ($P < 0.01$)。而喷雾干燥噬菌体鸡尾酒组第 1 天仅上升 (22.87 ± 17.65) pg/mL, 在第 2 天后逐渐回落至 (74.44 ± 6.83) pg/mL, 第 7 天接近正常水平, 与阴性对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。对不同组小鼠血液中 TNF- α 和 IL-1 β 的测定结果再次表明, 喷雾干燥微囊粉剂较游离化噬菌体鸡尾酒的治疗效果更好。

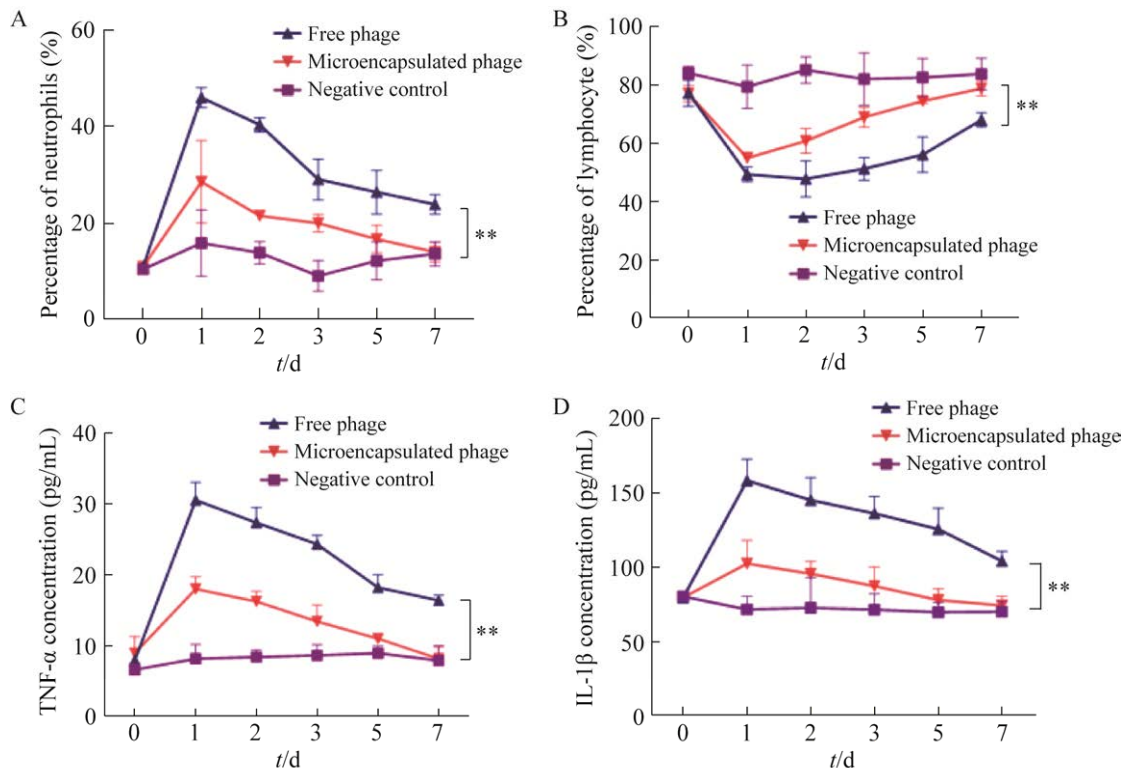


图 9 小鼠血液中炎症细胞及炎症因子水平

Figure 9 Changes of inflammatory cells and inflammatory factor in blood of mice. A: The change of neutrophils in the blood of mice. B: The change of lymphocytes in the blood of mice. C: The change of TNF- α in mouse serum. D: The change of IL-1 β in mouse serum. **: Significant difference between the free phage group and the microencapsulated phage group ($P < 0.01$).

2.5.4 粪便中细菌载量及噬菌体效价的变化

图 10A 为 1–7 d 内 3 组小鼠粪便中大肠杆菌 O157:H7 的浓度变化, 从图中可以得出, 游离噬菌体组与微囊化噬菌体组粪便内的 O157:H7 含量均在第 1 天到达最高值, 游离化噬菌体鸡尾酒组可达到 $(6.73 \pm 0.13) \log_{10}$ CFU/g, 微囊化噬菌体组细菌载量则偏低, 仅 $(4.41 \pm 0.17) \log_{10}$ CFU/g, 这可能是由于喷雾干燥噬菌体微囊粉剂的作用导致的。之后 6 d 内, 游离化噬菌体组每天都能检出 O157:H7 存在, 而微囊化噬菌体组第 3 天后粪便中的细菌浓度就降低至 $3 \log_{10}$ CFU/g 以下, 第 5 天便检测不到粪便中的 O157:H7, 结

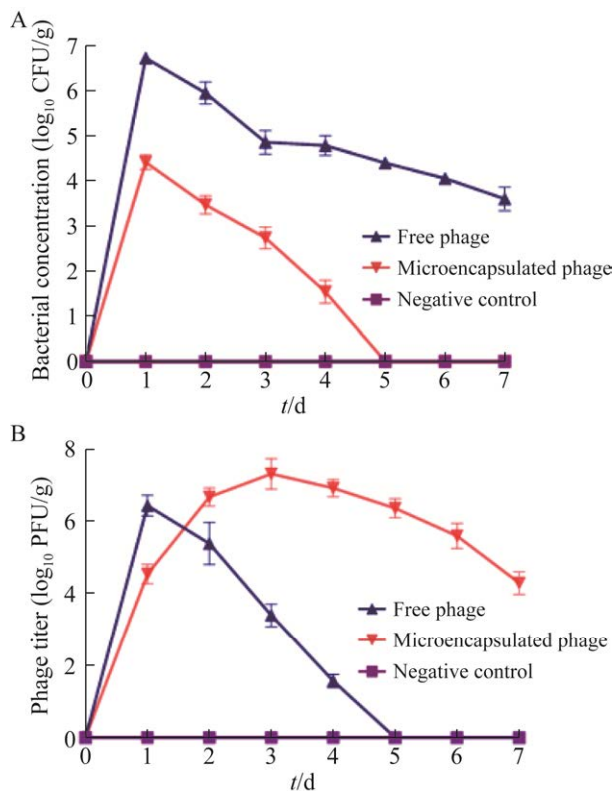


图 10 粪便中细菌浓度及噬菌体效价变化
Figure 10 Changes of bacterial concentration and phage titer in feces. A: The change in the concentration of *E. coli* O157:H7 in the feces of the three groups of mice within one week. B: The change in the titer of the phage cocktail in the feces of the three groups of mice within one week.

果表明喷雾干燥微囊粉剂较游离化噬菌体对大肠杆菌 O157:H7 的清除效果更好。

与此同时, 从图 10B 中可以看出游离化噬菌体组小鼠粪便中的噬菌体滴度在给药后第 1 天到达最高值, 后噬菌体效价逐渐下降, 第 5 天则检测不到粪便中的噬菌体, 而微囊化噬菌体组噬菌体滴度不断升高, 在给药后第 3 天最高, 达到 10^7 PFU/g, 之后活性有所降低, 但在第 7 天仍能检测到噬菌体存在, 结果表明喷雾干燥微囊粉剂能够更好的维持噬菌体在体内的稳定性, 延长其存活时间。

2.5.5 小鼠肠道病理学观察

解剖小鼠的小肠组织切片如图 11 所示, 从图 11A、11B 可以看出, 正常组小鼠的小肠绒毛保持完整平滑, 肠壁较厚, 噬菌体微囊粉剂组肠绒毛有轻微脱落现象, 基本维持其正常形态, 但游离噬菌体组肠绒毛组织破损脱落程度更为严重, 且肠壁肉眼显著变薄。从图 11C 中还可以发现游离噬菌体组小肠内部有轻微出血现象, 并观察到有中性粒细胞存在, 表明游离噬菌体组较噬菌体微囊粉剂组小鼠的炎症反应更加剧烈。

3 讨论与结论

目前, 喷雾干燥技术已经广泛应用于多种生物和热敏材料, 它不仅可以改善气雾剂的性能, 还可以改善物质的理化稳定性和药物释放情况等^[16]。对于噬菌体而言, 为了防止衣壳蛋白和核酸在喷雾干燥和储存的过程中被降解, 需要在待干燥的样品中加入稳定的保护剂。常用于喷雾干燥的保护剂主要包括糖类、氨基酸类、多元醇类和蛋白类等^[17]。海藻糖是一种较稳定的非还原性双糖, 其羟基可以替代水分子与噬菌体的衣壳蛋白表面部分结合形成氢键^[18], 乳糖可能是由于其还原性和吸湿性, 不适合作为

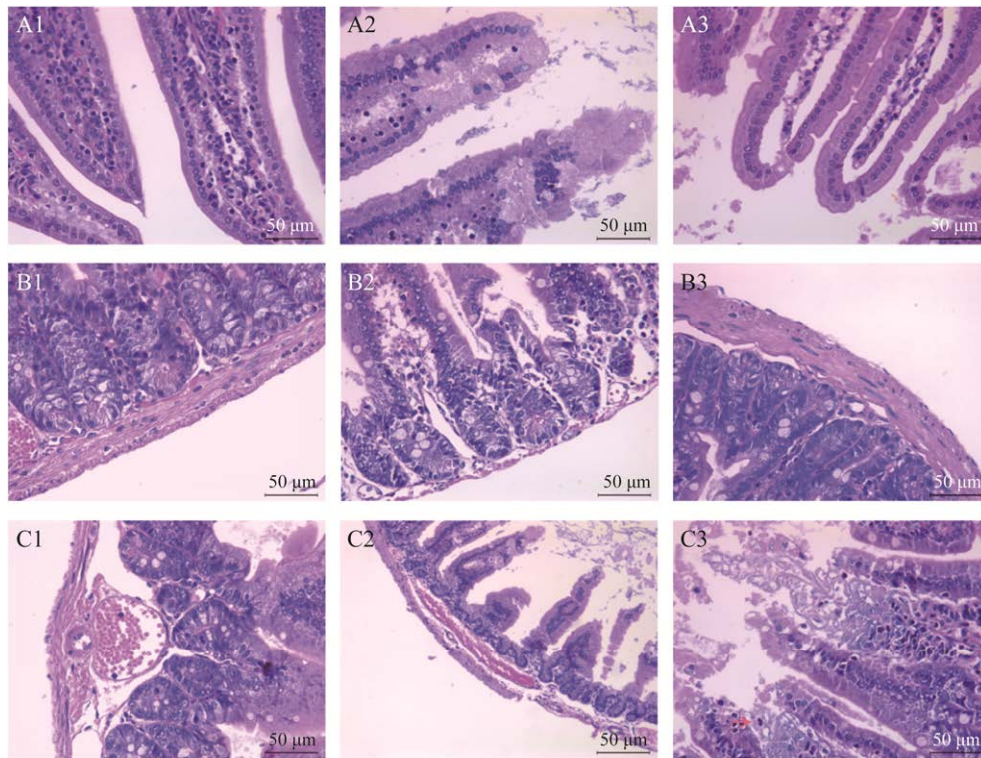


图 11 三组小鼠的小肠组织病理学变化

Figure 11 Histopathological changes of small intestine in three groups of mice. A1, A2 and A3 are the pathological changes of the small intestinal villi in the no-phage group, the free phage group and the phage microsphere powder group, respectively. B1, B2 and B3 are the pathological changes of the intestinal wall of the small intestine in the no-phage group, the free phage group, and the phage microsphere powder group, respectively. C1 and C2 are pictures of the small intestine blood vessels in the phage microsphere powder group and the free phage group, and the arrow in C3 shows the neutrophils in the small intestine of the free phage group. The magnification of mouse intestinal tissue is 400 times.

噬菌体的赋形剂^[19]。疏水性氨基酸——L-亮氨酸，是制备固体干粉的常用氨基酸，其特殊的疏水性质可以使其在雾滴表面缔合，防止颗粒凝聚，起到润滑的作用，具有良好的流动性^[20-21]。它的表面活性使其形成一层亮氨酸表层，干扰水蒸气的扩散，形成中空颗粒从而提高粉末的分散性^[22-24]。从而本研究筛选出亮氨酸和海藻糖的配方组合，相较于壳聚糖、蔗糖、乳糖及部分糖类与氨基酸组合等对噬菌体鸡尾酒的影响最小，对噬菌体起到了很好的包裹作用，使其在喷雾干燥的过程中免受高温干燥和剪切力

的影响，仍保持一定的生物学稳定性。此外，噬菌体鸡尾酒喷雾干燥微囊粉剂的保存稳定性，很大程度上取决于固体干粉内海藻糖所形成的一种玻璃状防护层，被称为无定形玻璃相，玻璃相的稳定性通常与玻璃化转变温度(glass transition temperature, T_g)有关^[25]。海藻糖的玻璃化转变温度较高，在干燥的室温储存条件下基本维持在玻璃态而不发生转变，这使得其能够稳定包裹微球内的蛋白质、核酸、脂类、糖类等组分不受破坏，相比于液体剂型，能够在常温或更低的温度下长期储存，但仍保留微囊粉

剂内部噬菌体鸡尾酒的活性，潜在消除了低温运输的需要^[26]。并且，喷雾干燥噬菌体微囊粉剂的重量和体积均比液体剂型更小，可以降低噬菌体在运输过程中的成本和对存储空间的要求^[27]。喷雾干燥技术的应用和其对噬菌体的保护作用仍旧是我们需要不断深入研究和探讨的课题。

噬菌体是在制备和储存过程中需要保护的一种生物实体，当噬菌体进入机体后，其胃部的恶劣环境及暴露在胆汁和胃肠道中的消化酶，使噬菌体在口服给药治疗方面有一定的阻碍^[28-29]。先前研究人员对噬菌体包裹的研究主要集中在挤压法和液面聚合法上，但这些方法成本高昂并且很难实现规模化^[30]。近几年有报道利用喷雾干燥技术生产适合吸入性治疗和肺部给药的噬菌体微粒，其作为可扩展的低成本方法，也适合于制备将噬菌体稳定输送到胃肠道的口服微球^[31]。本研究通过测试噬菌体鸡尾酒微囊粉剂在模拟体液中的稳定性发现，微囊化噬菌体在模拟胃液和胆盐中较游离噬菌体稳定性更高，对胃酸和胆盐均有一定的耐受能力，并且能够在肠液中持续稳定存在，一定程度上减少和消除了体内恶劣环境对噬菌体造成的不利影响，为其在口服固体制剂中的应用开创了可能性^[32]，后期应持续探究保护剂的浓度和组成对噬菌体鸡尾酒在体内释放作用的影响。

由于小动物模型购买和饲养的成本相对较低，易于护理和处理，且小鼠品系间的遗传背景差异小，故本研究选择 ICR 小鼠作为噬菌体微囊粉剂体内治疗效果评估的对象。2 组感染后分别使用游离噬菌体和微囊化噬菌体治疗，从炎性细胞的变化情况可以发现，2 组小鼠的中性粒细胞水平先升高，后缓慢下降，这表明在噬菌体作用下小鼠的炎症反应逐渐减弱^[33]。血液内的 TNF- α 和 IL-1 β 均与中性粒细胞有相

同的变化趋势，且相较于游离噬菌体组，喷雾干燥微囊粉剂组各炎性体征的变化幅度更小，基于整体研究对噬菌体体内治疗效果的评估，得出喷雾干燥噬菌体鸡尾酒微囊粉剂的治疗效果优于游离噬菌体鸡尾酒。有研究表明，选择多次给予高滴度的噬菌体鸡尾酒能够有效减少胃肠道不同部位的大肠杆菌浓度^[34]。噬菌体治疗失败的原因可能是由于其未达到触发感染循环所需的浓度，或其对胃肠道条件不耐受导致机体免疫系统发挥作用将其灭活^[35]。噬菌体体内治疗除口服给药之外，还包括滴鼻给药、局部注射、腹腔注射或全身给药等，无论选择何种给药途径，都必须保证能够将噬菌体运送到感染器官，与目标病原体相互接触并将其逐渐清除，可以针对不同细菌性疾病所引起的临床症状选择合适的给药方式。虽然目前噬菌体治疗还存在诸多问题亟待解决，但作为一种替代抗生素的可行性选择，在未来一定会找到更安全、更有效的噬菌体治疗方案。

参考文献

- [1] WANG LL, QU KL, LI XY, CAO ZH, WANG XT, LI Z, SONG YX, XU YP. Use of bacteriophages to control *Escherichia coli* O157:H7 in domestic ruminants, meat products, and fruits and vegetables[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2017, 14(9): 483-493.
- [2] ABULADZE T, LI MR, MENETREZ MY, DEAN T, SENEAL A, SULAKVELIDZE A. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(20): 6230-6238.
- [3] VIAZIS S, AKHTAR M, FEIRTAG J, DIEZ-GONZALEZ F. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1): 37-42.
- [4] PATEL J, SHARMA M, MILLNER P, CALAWAY T, SINGH M. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7

- attached to spinach harvester blade using bacteriophage[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, 8(4): 541-546.
- [5] TANJI Y, SHIMADA T, FUKUDOMI H, MIYANAGA K, NAKAI Y, UNNO H. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(3): 280-287.
- [6] SMITH HW, HUGGINS MB, SHAW KM. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment[J]. *Journal of General Microbiology*, 1987, 133(5): 1127-1135.
- [7] DRYING Y. Improvement in drying and concentrating liquid substances by atomizing[P]. US: US125406 A.1872-04-09.
- [8] CARRIGY NB, LIANG L, WANG H, KARIUKI S, NAGEL TE, CONNERTON IF, VEHRING R. Spray-dried anti-campylobacter bacteriophage CP30A powder suitable for global distribution without cold chain infrastructure[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 569: 118601.
- [9] SOU T, KAMINSKAS LM, NGUYEN TH, CARLBERG R, MCINTOSH MP, MORTON DA. The effect of amino acid excipients on morphology and solid-state properties of multi-component spray-dried formulations for pulmonary delivery of biomacromolecules[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, 83(2): 234-243.
- [10] VEHRING R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying[J]. *Pharmaceutical Research*, 2008, 25(5): 999-1022.
- [11] MALIK DJ. Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2021, 40: 303-316.
- [12] NGUYEN Y, SPERANDIO V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012, 2: 90.
- [13] WALTERSPIEL NJ, ASHKENAZI S, MORROW LA, CLEARY GT. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular shiga-like toxin I[J]. *Infection*, 1992, 20(1): 25-29.
- [14] SALEHE S, SEPEHRIZADEH Z, AMIRPOUR-ROSTAMI S, SKURNIK M. A minireview on the *in vitro* and *in vivo* experiments with anti-*Escherichia coli* O157:H7 phages as potential biocontrol and phage therapy agents[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 243: 52-57.
- [15] MA YS, PACAN JC, WANG Q, XU YP, HUANG XQ, KORENEVSKY A, SABOUR PM. Microencapsulation of bacteriophage felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4799-4805.
- [16] LIN Y, CHANG RYK, BRITTON WJ, MORALES S, KUTTER E, LI J, CHAN HK. Inhalable combination powder formulations of phage and ciprofloxacin for *P. aeruginosa* respiratory infections[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e V*, 2019, 142: 543-552.
- [17] 王道军, 曾丽文, 胡凝珠, 胡云章. 喷雾干燥法制备 1 型糖尿病反义肽噬菌体壳聚糖微球疫苗[J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(5): 480-482.
- WANG DJ, ZENG LW, HU NZ, HU YZ. Preparation of bacteriophage-displayed diabetes type 1 vaccine in chitosan microspheres by spray drying[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2009, 22(5): 480-482 (in Chinese).
- [18] 曾丽文. 喷雾干燥法制备脊髓灰质炎微球减毒活疫苗[D]. 北京: 中国协和医科大学硕士学位论文, 2009.
- ZENG LW. Preparation of attenuated live poliomyelitis vaccine microspheres by spray drying[D]. Beijing: Master's Thesis of Peking Union Medical College, 2009 (in Chinese).
- [19] VANDENHEUVEL D, MEEUS J, LAVIGNE R, VAN DMG. Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 472(1/2): 202-205.
- [20] CHANG RYK, WALLIN M, KUTTER E, MORALES S, BRITTON W, LI J, CHAN HK. Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 560: 11-18.
- [21] CHANG RY, WONG J, MATHAI A, MORALES S, KUTTER E, BRITTON W, LI J, CHAN HK. Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e V*, 2017, 121: 1-13.

- [22] FENG AL, BORAHEY MA, GWIN MA, FINLAY PR, KUEHL PJ, VEHRING R. Mechanistic models facilitate efficient development of leucine containing microparticles for pulmonary drug delivery[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 409(1/2): 156-163.
- [23] LI L, SUN SP, PARUMASIVAM T, DENMAN JA, GENGENBACH T, TANG P, MAO SR, CHAN HK. L-leucine as an excipient against moisture on *in vitro* aerosolization performances of highly hygroscopic spray-dried powders[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e V*, 2016, 102: 132-141.
- [24] LEAROYD TP, BURROWS JL, FRENCH E, SEVILLE PC. Sustained delivery by leucine-modified chitosan spray-dried respirable powders[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 372(1/2): 97-104.
- [25] CHANG RYK, KWOK PCL, KHANAL D, MORALES S, KUTTER E, LI J, CHAN HK. Inhalable bacteriophage powders: glass transition temperature and bioactivity stabilization[J]. *Bioengineering & Translational Medicine*, 2020, 5(2): e10159.
- [26] GRASMEIJER N, STANKOVIC M, de WAARD H, FRIJLINK HW, HINRICHS WJ. Unraveling protein stabilization mechanisms: vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1834(4): 763-769.
- [27] WALTERS RH, BHATNAGAR B, TCHESALOV S, IZUTSU KI, TSUMOTO K, OHTAKE S. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 103(9): 2673-2695.
- [28] JOŃCZYK E, KŁAK M, MIĘDZYBRODZKI R, GÓRSKI A. The influence of external factors on bacteriophages—review[J]. *Folia Microbiologica*, 2011, 56(3): 191-200.
- [29] COLOM J, CANO-SARABIA M, OTERO J, ARÍÑEZ-SORIANO J, CORTÉS P, MASPOCH D, LLAGOSTERA M. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: a strategy for improved phage therapy[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41441.
- [30] VINNER GK, VLADISAVLJEVIĆ GT, CLOKIE MRJ, MALIK DJ. Microencapsulation of *Clostridium difficile* specific bacteriophages using microfluidic glass capillary devices for colon delivery using pH triggered release[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186239.
- [31] CORBANIE EA, REMON JP, van REETH K, LANDMAN WM, van ECK JHH, VERVAET C. Spray drying of an attenuated live Newcastle disease vaccine virus intended for respiratory mass vaccination of poultry[J]. *Vaccine*, 2007, 25(49): 8306-8317.
- [32] VINNER GK, REZAIE-YAZDI Z, LEPPANEN M, STAPLEY AGF, LEAPER MC, MALIK DJ. Microencapsulation of *Salmonella*-specific bacteriophage felix O1 using spray-drying in a pH-responsive formulation and direct compression tableting of powders into a solid oral dosage form[J]. *Pharmaceutics (Basel, Switzerland)*, 2019, 12(1): 43.
- [33] LIN Y, QUAN DA, CHANG RYK, CHOW MYT, WANG YC, LI MY, MORALES S, BRITTON WJ, KUTTER E, LI J, CHAN HK. Synergistic activity of phage PEV20-ciprofloxacin combination powder formulation—a proof-of-principle study in a *P. aeruginosa* lung infection model[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2021, 158: 166-171.
- [34] STANFORD K, McALLISTER TA, NIU YD, STEPHENS TP, MAZZOCCO A, WADDELL TE, JOHNSON RP. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle[J]. *Journal of Food Protection*, 2010, 73(7): 1304-1312.
- [35] OLIVEIRA A, SERENO R, NICOLAU A, AZEREDO J. The influence of the mode of administration in the dissemination of three coliphages in chickens[J]. *Poultry Science*, 2009, 88(4): 728-733.