

Zuwendungsempfänger Universitätsklinikum Jena	Förderkennzeichen FKZ 01KI2306	
Vorhabenbezeichnung Verbund: StopStaphGrowth: Optimierung der Hemmung von <i>Staphylococcus aureus</i> durch Biotherapie bei persistierenden bakteriämischen Infektionen		
Teilvorhaben: Optimierung der Hemmung von <i>Staphylococcus aureus</i> durch Biotherapie bei persistierenden und bakteriämischen Infektionen		
Laufzeit des Vorhabens 01.04.2023-31.03.2025	Berichtszeitraum 01.04.2023-31.03.2025	Berichtszeitpunkt 31.3.2025

Teil I: Kurzbericht

Bi-Therapie gegen intrazelluläre *Staphylococcus aureus*-Infektionen: Bewertung von freiem und Liposom-gekapseltem AFN-1252 und Rifampicin bei Infektionen von Osteoblasten

Ziel des im Rahmen des BMFTR-geförderten Verbundprojekts StopStaphGrowth durchgeführten Teilvorhabens war die Entwicklung und präklinische Bewertung neuartiger Kombinationsstrategien gegen intrazelluläre *Staphylococcus-aureus*-Infektionen in Knochenzellen.

Persistente Infektionen mit *Staphylococcus aureus* im Knochen sind aufgrund der Fähigkeit des Erregers, intrazellulär zu überleben und zu persistieren, schwer zu behandeln. Insbesondere die intrazelluläre Lokalisierung schützt den Erreger nicht nur vor der Beseitigung durch Immunzellen, sondern verringert auch die Wirksamkeit herkömmlicher Antibiotika. Darüber hinaus erschwert die schlechte Penetration von Antibiotika in die tiefer liegenden infizierten Gewebeschichten die Behandlung zusätzlich und trägt zu wiederkehrenden Infektionen bei.

In dieser Studie wurde die Wirksamkeit einer Kombination aus AFN-1252, einem Inhibitor des Fettsäuresynthesewegs, und bestimmten Antibiotika (Rifampicin, Mupirocin und Lysostaphin) untersucht. In den anfänglichen Experimenten zeigte Rifampicin die beste Wirksamkeit bei der Beseitigung der Bakterien im Zellkulturmodell, sodass sich die weiteren Experimente auf diese Substanz konzentrierten. Rifampicin ist zudem ein klinisch etabliertes Antibiotikum mit intrazellulärer Aktivität, das auch gegen den Stamm USA300 von *S. aureus* gute Wirkung zeigt. Die antimikrobielle Aktivität der ausgewählten Verbindungen wurde zunächst in Zellkultur-ähnlichen Medien getestet, um die minimale Hemmkonzentration (MHK) und mögliche Arzneimittelsynergien zu bestimmen. Anschließend wurde die Wirksamkeit von AFN und Rifampicin sowohl in Einzel- als auch in Doppelbehandlungen unter Verwendung der menschlichen Osteoblastenzelllinie Saos-2 als intrazelluläres Infektionsmodell getestet. Schließlich wurde die liposomenverkapselte Formulierung der drei Antibiotika im gleichen Infektionsmodell bewertet, um die Wirksamkeit der gekapselten Wirkstoffe mit der des jeweiligen freien Wirkstoffs zu vergleichen.

AFN-1252 zeigte eine anti-Staphylokokken-Aktivität mit einer MHK von 2 µg/ml und verstärkte den Effekt bei einer niedrigeren Rifampicin-Konzentration (0,15 µg und 0,30µg/ml) in-vitro. Im intrazellulären Versuchsmodell mit der Saos-2-Zelllinie konnten wir jedoch keinen zusätzlichen Nutzen einer Doppelbehandlung feststellen. Ebenso konnten wir keine bessere Clearance mit den gekapselten Wirkstoffen erzielen. Unsere Ergebnisse können daher keinen zusätzlichen Effekt einer Doppelbehandlung in unserem Zellkultur-Infektionsmodell von Osteoblasten aufzeigen. Diese Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse über die begrenzte Wirksamkeit kombinierter und liposomaler Ansätze gegen intrazellulär persistierende Staphylokokken und können zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen.

Das Teilvorhaben wurde im Rahmen des BMFTR-Verbundprojekts StopStaphGrowth in enger Kooperation mit den akademischen Partnern (Institute Pasteur (Paris, Frankreich), Institute National de la Recherche Medicale (Paris, Frankreich) und Universidade de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, Spanien) durchgeführt. Unsere spanischen Partner stellten die liposomalen Formulierungen bereit, während die experimentellen Untersuchungen am eigenen Standort erfolgten. Regelmäßige Abstimmungen im Verbund gewährleisteten eine enge inhaltliche Verzahnung der Arbeitspakete.

Schlüsselwörter: *Staphylococcus aureus*, Osteomyelitis, AFN-1252, Rifampicin, liposomale Verabreichung, intrazelluläre Infektion

Zuwendungsempfänger Universitätsklinikum Jena	Förderkennzeichen FKZ 01KI2306	
Vorhabenbezeichnung Verbund: StopStaphGrowth: Optimierung der Hemmung von <i>Staphylococcus aureus</i> durch Biotherapie bei persistierenden bakteriämischen Infektionen Teilvorhaben: Optimierung der Hemmung von <i>Staphylococcus aureus</i> durch Biotherapie bei persistierenden und bakteriämischen Infektionen		
Laufzeit des Vorhabens 01.04.2023-31.03.2025	Berichtszeitraum 01.04.2023-31.03.2025	Berichtszeitpunkt 31.3.2025

Teil II: Eingehende Darstellung

Bi-Therapie gegen intrazelluläre *Staphylococcus aureus*-Infektionen: Bewertung von freiem und Liposom-gekapseltem AFN-1252 und Rifampicin bei Infektionen von Osteoblasten

Einleitung

Knochen- und Gelenkinfektionen, die durch *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) verursacht werden, stellen eine erhebliche klinische Herausforderung dar, insbesondere, wenn sie einen chronischen Verlauf nehmen (Zelmer et al., 2022). Die Persistenz der Infektion wird auf mehrere Überlebensstrategien des Erregers zurückgeführt, wie die Bildung von Biofilmen, das Eindringen in das osteozytäre- lakunäre Kanalikulärsystem (OLCN) und die Besiedlung von Knochenzellen (Rong et al., 2025; Masters et al., 2021; Gimza & Cassat, 2021).

S. aureus hat Mechanismen entwickelt, um in Knochenzellen (Osteoblasten und Osteozyten) einzudringen, um dort zu persistieren (Collet et al., 2025; Garcia-Moreno et al., 2022). Nach der Internalisierung nehmen die Bakterien einen ruhenden Phänotyp an, der durch kleine Kolonievarianten (small colony variants; SCVs) gekennzeichnet ist, die eine verringerte Stoffwechselaktivität, langsames Wachstum und eine Toleranz gegenüber Antibiotika aufweisen (Mashayamombe et al., 2023; Tuchscherer et al., 2020). Eine aktuelle Studie hat Osteozyten als primäres Reservoir für die Persistenz intrazellulärer *S. aureus* Keime identifiziert, da sie im Vergleich zu Osteoblasten eine geringere antimikrobielle Aktivität aufweisen (Garcia-Moreno et al., 2022). Darüber hinaus haben aus chronischen Knocheninfektionen isolierte SCVs eine erhöhte Invasionsfähigkeit zur Besiedlung von Knochengewebe gezeigt, was zur Pathogenese der chronischen Osteomyelitis beitragen könnte (Cai et al., 2022; Kalinka et al., 2014).

Die Eigenschaften von Knochengewebe zeigen einige Hindernisse für die Antibiotikatherapie. Es weist eine geringe Durchlässigkeit auf, was die Penetration des Medikaments insbesondere in infizierten Bereichen einschränkt (Nie et al., 2022). Studien zeigen, dass Antibiotika wie β -Lactam nur 10–40 % der Serumkonzentrationen im Knochengewebe erreichen, während Vancomycin nur begrenzt in den Knochen eindringt (Landersdorfer et al., 2009; Landersdorfer et al., 2022). Darüber hinaus sind die intrazellulären Bakterien oft vor Antibiotika geschützt, gerade wenn sie die Wirtszellmembran nicht effektiv durchdringen können (Hardie et al., 2022).

AFN-1252 (AFN) ist ein selektiver Inhibitor der *S. aureus*-Enoyl-Acyl-Trägerprotein- Reduktase (FabI), einem Schlüsselenzym in der Biosynthese bakterieller Fettsäuren (Karlowsky et al., 2009). Diese Verbindung zeigt eine Wirksamkeit gegen klinische Isolate von *S. aureus* mit einer MHK von 0,002–0,12 $\mu\text{g/ml}$. Die höchste für AFN beobachtete MHK beträgt 0,5 $\mu\text{g/ml}$ für ein einzelnes *Staphylococcus epidermidis*- Isolat (Kaplan et al., 2012). Im Gegensatz dazu ist Rifampicin aufgrund seiner hohen Lipophilie wirksam bei der Bekämpfung intrazellulärer Infektionen und biofilmassoziiertes Bakterien (Zimmerli & Sendi, 2018; Ferreira et al., 2024). Die lipophile Natur von Rifampicin (Rif) ermöglicht das

Eindringen des Wirkstoffs in die Wirtszellen und das Knochengewebe, wodurch eine Konzentration erreicht wird, die mit den Serumspiegeln vergleichbar ist (El Zein et al., 2023). Die schnelle Resistenz gegen Rif schränkt jedoch dessen Einsatz in der Monotherapie ein, sodass eine Kombinationstherapie erforderlich ist (El Zein et al., 2023). Darüber hinaus bieten liposomale Wirkstofffreisetzungssysteme erhebliche Vorteile für die Behandlung von Knocheninfektionen, da sie die Stabilität des Wirkstoffs erhöhen, die zelluläre Aufnahme verbessern und eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs ermöglichen (Ferreira et al., 2021; Ferreira, Ogren, et al., 2021).

Ziel dieser Studie war die Bewertung folgender Aspekte: (1) des *in-vitro*-Potenzials einer Kombinationsbehandlung mit AFN-1252 und Rifampicin sowie (2), der Wirksamkeit freier Wirkstoffe im Vergleich zu verkapselten Wirkstoffen gegen intrazelluläre *S. aureus*-Bakterien. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Kombinationsbehandlung der intrazellulären Bakterien mit AFN und Rif durch die Liposomenverkapselung (sowie weiterer Antibiotika) zu einer besseren Clearance führen könnte.

Methoden

Bakterienstamm und Kulturbedingungen

Aufgrund seiner klinischen Relevanz und Verbreitung als Laborstamm wurde der Stamm *S. aureus* USA300 ausgewählt. Die Bakterien wurden in Brain-Heart-Infusion (BHI)-Bouillon mit 10 % FCS und einer Mischung aus langkettigen Fettsäuren im Verhältnis 1:1:1 (C14:0, C16:0 und C18:1) kultiviert. Die Bakterien wurden über Nacht (ONC) kultiviert, um Bedingungen im Wirt zu simulieren und die Expression der bakteriellen Virulenz zu verstärken. Logarithmische Phasenkulturen (OD578 = 1) wurden durch Verdünnen von ONC in frischem Brain Heart Infusion-Medium, ergänzt mit Serum und Fettsäuren (BHI-SerFa), hergestellt und 3 Stunden lang bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (175 U/min) inkubiert. Die Bakterienkonzentrationen wurden durch Ausplattieren der seriellen Verdünnung von OD1 auf einer Blutagarplatte bestimmt. Die OD1-Vorräte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Wachstumskurven wurden ebenfalls unter verschiedenen Medienbedingungen unter Verwendung von TECAN bei OD600 nm erstellt.

Antimikrobielle Wirkstoffe

AFN-1252 wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, um eine 10 mg/ml-Stammlösung herzustellen. Rifampicin wurde ebenfalls in absolutem Ethanol gelöst, um eine 10 mg/ml-Stammlösung zu erhalten. Die Arbeitskonzentrationen wurden durch serielle Verdünnung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) hergestellt. Die endgültige DMSO-Konzentration wurde in allen Assays unter 2 % gehalten, um zytotoxische Effekte zu vermeiden. Darüber hinaus stellte der Unternehmenspartner liposombeschichtete Medikamente zur Verfügung, die später in unserem Zellkulturmodell getestet wurden. Lysostaphin (Lys) und Mupirocin (Mup) wurden ebenfalls in einer Stammlösung von 10 µg/ml hergestellt. Sie wurden weiter auf die Arbeitskonzentration verdünnt, entsprechend den getesteten Konzentrationen in den Zellkulturexperimenten in freier und liposomaler Form.

Bestimmung der MHK

Der Test zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde unter Verwendung einer Mikrodilutionsmethode in 96-Well-Platten durchgeführt, um die niedrigste Konzentration der Antibiotika zu bestimmen, die das sichtbare Wachstum hemmt. Die Bakterienstämme wurden über Nacht in Muller-Hinton-Bouillon kultiviert, auf 0,5 McFarland eingestellt und auf 5×10^5 KBE/ml verdünnt. Eine zweifache serielle Verdünnung der Antibiotika wurde über die Platte hinweg vorbereitet, und die Wells wurden mit der Bakteriensuspension beimpft und 16 bis 24 Stunden lang ohne Schütteln bei 37 °C inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde sowohl visuell als auch durch Ausplattieren auf Blutagarplatten anhand der sichtbaren Koloniebildung beurteilt.

Zellkultur und Osteoblasten-Infektionsmodell

Als Osteoblasten-Modellsystem wurden aus menschlichem Osteosarkom gewonnene SaOS-2-Zellen

verwendet. Diese Zelllinie wurde für die Untersuchung intrazellulärer Infektionen mit *S. aureus* umfassend validiert und bietet ein reproduzierbares Modell für die Untersuchung von Wirt-Pathogen-Interaktionen. Die Zellen wurden in Advanced DMEM, ergänzt mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

Für Infektionsexperimente wurden SaOS-2-Zellen mit einer Dichte von 1 × 10⁵ Zellen pro Vertiefung in 12-Well-Kulturplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Vor der Infektion wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und frisches antibiotikafreies Invasionsmedium mit 10 mM HEPES und 1 % Humanalbumin (HAS) hinzugefügt. *S. aureus* USA300 OD1-Stämme wurden hinzugefügt, um eine Multiplizität der Infektion (MOI) von 100:1 Bakterien pro Zelle zu erreichen, basierend auf Optimierungsstudien, die zeigen, dass dieses Verhältnis eine konsistente intrazelluläre Infektion ohne übermäßige Zytotoxizität erzeugt.

Die infizierten Zellen wurden 90 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, um die Internalisierung der Bakterien zu ermöglichen. Nach dieser Invasionsphase wurden die extrazellulären Bakterien durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt, und die Zellen wurden 30 Minuten lang mit Lysostaphin (2 µg/ml) behandelt, um nicht internalisierte Bakterien zu eliminieren. Diese Konzentration wurde auf der Grundlage früherer Studien gewählt, die eine wirksame Abtötung von extrazellulären *S. aureus* bei minimaler Wirkung auf intrazelluläre Bakterien gezeigt hatten. Nach der Behandlung wurden die Zellen gewaschen und weitere 24 Stunden in frischem Vollmedium inkubiert, um vor der medikamentösen Behandlung eine stabile intrazelluläre Infektion herzustellen.

Antibiotikabehandlung

24 Stunden nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mit AFN, Rif (und weiteren Antibiotika) und deren Kombination in freier und liposomaler Formulierung behandelt. Die getesteten Wirkstoffkonzentrationen umfassten: AFN-1252 (0,5, 1, 2 und 4 × MHK), Rifampicin (0,5, 1, 2 und 4 × MHK) und Kombinationen in äquipotenten Verhältnissen. Liposomale Formulierungen wurden bei äquivalenten Wirkstoffkonzentrationen getestet. Die Behandlung wurde 24 Stunden lang bei 37 °C fortgesetzt.

Nach der Behandlung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 10 Minuten lang mit eiskaltem Wasser auf Eis lysiert, um intrazelluläre Bakterien freizusetzen. Die Zelllysate wurden in PBS seriell verdünnt und zur Koloniezählung auf Blutagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert und die Bakterienlasten wurden als log CFU/ml ausgedrückt.

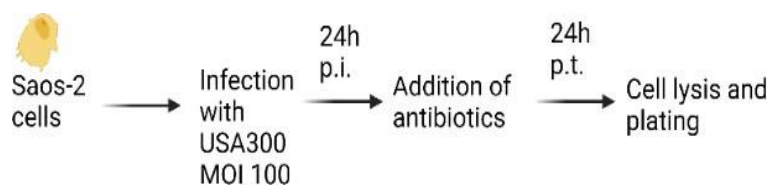


Abb. 1. Versuchsablauf des intrazellulären Infektionsmodells mit *S. aureus* USA300 in SaOS-2-Zellen. Nach Infektion (MOI 100:1) und Eliminierung extrazellulärer Bakterien mit Lysostaphin erfolgte eine 24-stündige Inkubation zur Etablierung einer stabilen intrazellulären Infektion. Anschließend wurden die Zellen mit AFN-1252, Rifampicin oder deren Kombination (frei bzw. liposomal formuliert) behandelt. Nach der Therapie wurden die Zellen lysiert, und die intrazellulären Bakterien als log CFU/ml quantifiziert.

Bewertung der Zytotoxizität

Die Lebensfähigkeit der Wirtszellen wurde mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie (FACS) nach Behandlung mit AFN und Rif bewertet. Da PI ein membranunbeständiger Farbstoff ist, der selektiv nicht lebensfähige Zellen anfärbt, ermöglicht er eine genaue Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen mittels FACS. Nach der medikamentösen Behandlung wurden die Zellen 10 Minuten lang mit PI in unterschiedlicher Konzentration inkubiert und anschließend sofort mittels FACS analysiert, um den Prozentsatz der PI-positiven Zellen zu quantifizieren.

Statistische Analyse

Alle Experimente wurden in mindestens drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Bakterienzahl wurde vor der statistischen Analyse in CFU 10⁶ umgewandelt, um die Verteilung zu normalisieren. Gruppenvergleiche wurden mittels Einweg-ANOVA mit anschließendem Kruskal-Wallis-Test für multiple Vergleiche durchgeführt. * $p < 0,05$;

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism Version 9.0 (GraphPad Software) durchgeführt.

Ergebnisse

Bakterienwachstum mit Serum und Fettsäuren

Die Wachstumskinetik von USA300 wurde in Standard-BHI-Medien mit SerFa-Zusatz untersucht (**Abb. 2a**). Die Wachstumskurve zeigt, dass USA300 ohne SerFa über einen Zeitraum von 24 Stunden ein ähnliches Wachstum aufwies. Wir haben auch die Anpassung des Stammes an AFN-Antibiotika getestet (**Abb. 2b**). Das Wachstumsmuster von *S. aureus* USA300 wurde unter gastgeberähnlichen Bedingungen durch Zugabe von SerFa zum BHI-Medium bewertet, um die Rolle des Fettsäurestoffwechsels bei der Persistenz von Bakterien mit und ohne AFN zu untersuchen. Ohne das Medikament zeigt USA300 ein stetiges Wachstum, das nach etwa 3 Stunden seinen Höhepunkt erreicht. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit dem AFN-Medikament zu einer Wachstumshemmung, wobei die Werte nach etwa 10 Stunden ihren Höhepunkt erreichen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AFN das Bakterienwachstum in einem mit Fettsäuren angereicherten Medium hemmt. Wie in der Literatur berichtet, findet an diesem Punkt eine bakterielle Anpassung statt, und die Bakterien können Fettsäuren aus der Umgebung aufnehmen und Wachstum zeigen.

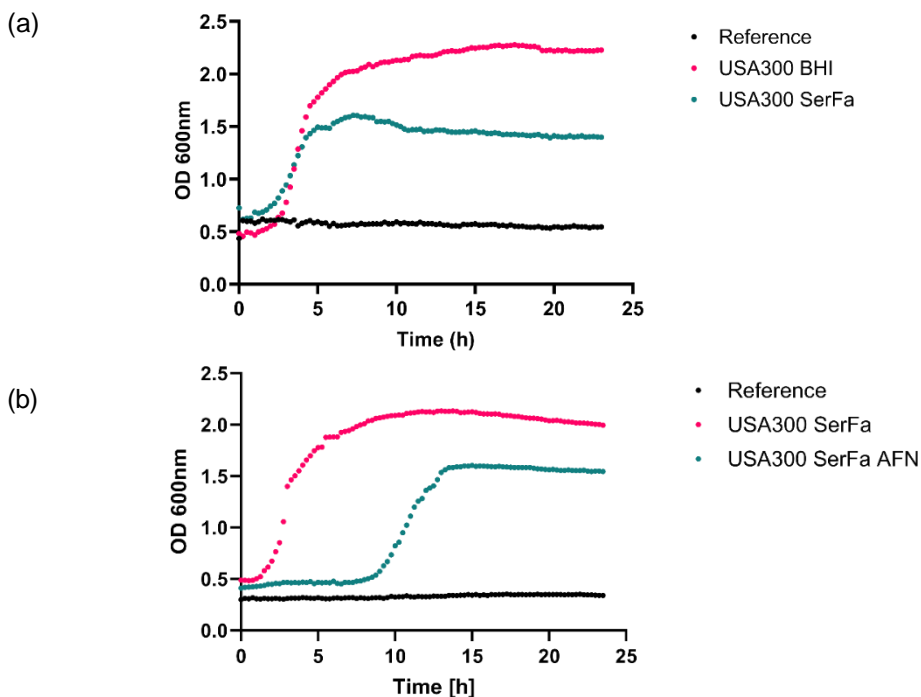


Abb. 2. Wachstumskurve von *S. aureus*-Stämmen, gemessen anhand der optischen Dichte bei 600 nm unter verschiedenen Bedingungen. (a) Wachstum des Wildtyp- Stammes in BHI- und SerFa-Medien. USA300 zeigt in beiden Medien ein robustes Wachstum. Die Referenzkurve stellt das Medium ohne Bakterienbeimpfung dar. **(b)** Wachstum des Wildtyp-Stammes USA300 in BHI-SerFa-Medien in Anwesenheit und Abwesenheit des Medikaments AFN. Die Kurve zeigt eine Hemmung/Verzögerung des Wachstums in Anwesenheit von AFN. Die Daten stellen den Mittelwert der OD600- Messungen über 24 Stunden dar. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit anschließendem Kruskal-Wallis-Test für multiple Vergleiche bestimmt.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Antibiotikaempfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber AFN-1252

Es wurde ein Diffusionstest (**Abb. 3**) durchgeführt, um die Empfindlichkeit von *S. aureus* USA300 und einer FakA-Mutante (Fettsäurekinase A), in der die Phospholipidsynthese dysreguliert ist, gegenüber AFN zu bewerten. Beide Stämme zeigten einen deutlichen Hemmhof ohne Anzeichen einer Resistenz bei 20 ng/ml. Der mittlere Durchmesser des Hemmhofes betrug bei beiden Stämmen etwa 3 cm.

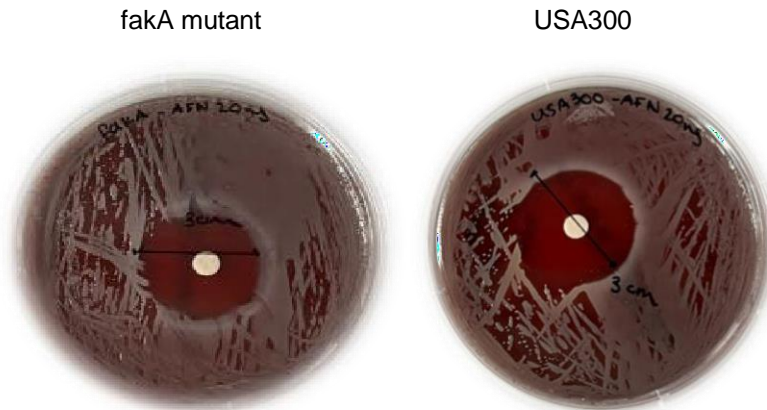


Abb. 3. Disk-Diffusionstest zur Bewertung der Wirksamkeit von AFN-1252 gegen *S. aureus* USA300 (rechts) und dessen isogenen fakA-Mutanten (links). Filterpapierscheiben wurden mit AFN-1252 in einer Konzentration von 20 ng beladen. Beide Stämme zeigten deutliche Hemmzonen von etwa 3 cm, was auf eine vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber AFN-1252 und das Fehlen einer nachweisbaren Resistenz hinweist.

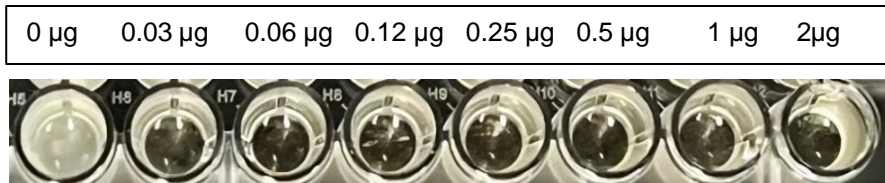
Antimikrobielle Aktivität: Test der minimalen Hemmkonzentration

Zunächst wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) von AFN gegen *S. aureus* USA300 anhand der koloniebildenden Einheiten (KBE) nach Behandlung mit verschiedenen AFN-Konzentrationen im Bereich von 0,03 µg/ml bis 2 µg/ml bestimmt. Bei der visuellen Untersuchung konnte selbst bei der niedrigsten Konzentration keine Trübung oder ein Wachstum im Medium festgestellt werden (**Abb. 4a**). Nach dem Ausplattieren des Mediums auf Blutagarplatten wurden jedoch KBE beobachtet. Mit steigender Konzentration des Wirkstoffs von 0 auf 2 µg/ml nahm die logarithmische CFU-Zahl von *S. aureus* deutlich ab. Die Ergebnisse weisen auf eine ausgeprägte dosisabhängige antimikrobielle Wirkung hin. Die Grafik (**Abb. 4b**) zeigt zudem, dass die höchste getestete Konzentration (2 µg/ml) zu der stärksten Reduktion lebensfähiger Kolonien führte. Auf Grundlage dieser Daten wurde 2 µg/ml als geeignete Konzentration für nachfolgende Experimente festgelegt.

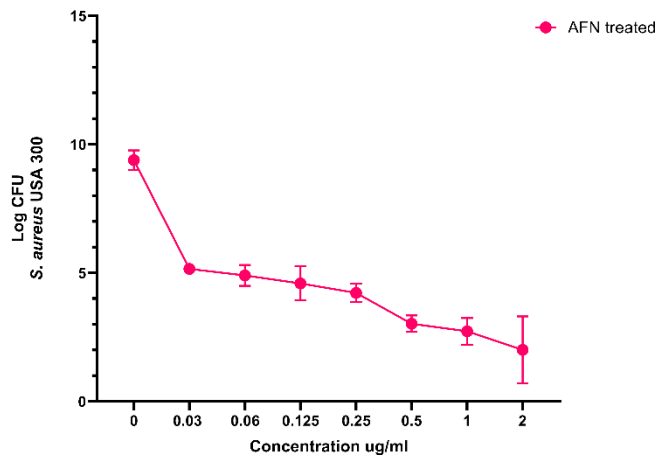
Um die kombinierte Wirkung von AFN und Rif gegen *S. aureus* zu bewerten, wurden die Bakterienkulturen mit einer konstanten Konzentration von AFN (2 µg/ml) und einer steigenden Konzentration von Rif behandelt. Die log-CFU-Werte wurden nach der Behandlung und Ausplattierung aufgezeichnet. Eine sichtbare Hemmung des Wachstums für Rif allein wurde bei 0,31–0,62 µg/ml festgestellt, während bei 5 µg/ml eine deutliche Abnahme der lebensfähigen Kolonien beobachtet wurde. Eine vollständige Eliminierung der Bakterienkolonien wurde bei 10 µg/ml beobachtet (**Abb. 4c, e**). Dies steht im Einklang mit den in der Literatur angegebenen MHK-Werten für Rif ([Guardabassi et al., 2019](#)).

Die Behandlung mit AFN (µg/ml) in Kombination mit Rif führte im Vergleich zu Rif allein über mehrere Verdünnungen hinweg zu einer geringeren CFU-Zahl, was auf einen möglichen additiven Effekt hindeutet. Die Daten bestätigten, dass die Doppelbehandlung bei der Abtötung der Bakterien wirksam ist, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen (0,15 und 0,31 µg/ml) von Rif (**Abb. 4d, e**).

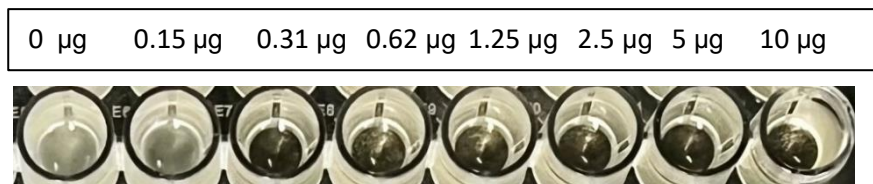
(a)



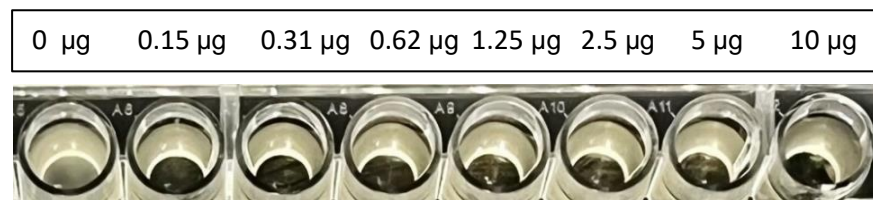
(b)



(c)



(d)



(e)

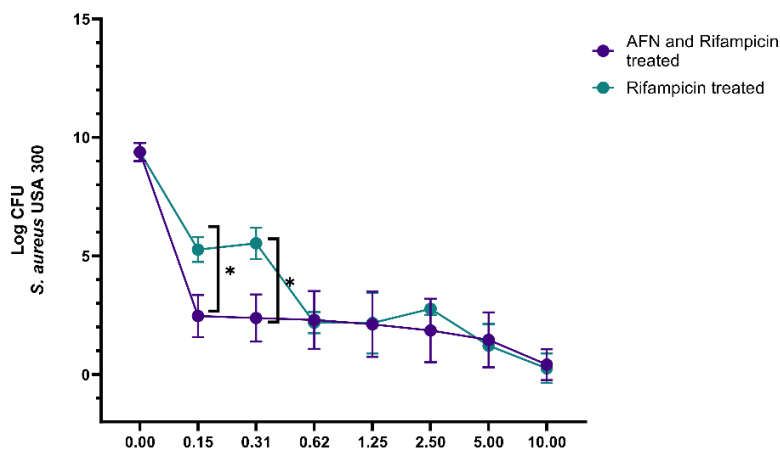


Abb. 4. Antimikrobielle Aktivität von AFN und Rif gegen *S. aureus*. (a, b) Die MHK von AFN wurde durch Messung der KBE nach Behandlung mit verschiedenen AFN- Konzentrationen im Bereich von 0,03 µg/ml bis µg/ml bestimmt. Trotz fehlender sichtbarer Trübung im Medium zeigte die KBE-Plattierung auf der Platte das Überleben von Bakterien bei niedrigeren Dosen. Bei 2 µg/ml wurde eine maximale dosisabhängige Abnahme der KBE beobachtet. (c, e) Eine Einzelbehandlung mit Rif zeigt bereits eine signifikante Verringerung der KBE. (d, e) Die Kombinationsbehandlung mit 2 µg/ml AFN und unterschiedlichen Rif-Konzentrationen (0,15 and 0,31 µg/ml) führte zu einer geringeren KBE-Zahl im Vergleich zur Einzelbehandlung, was auf einen additiven Effekt hindeutet. Die Daten stellen den Mittelwert ± Standardabweichung aus sechs Experimenten dar.

Behandlung der intrazellulären Infektion

Um die intrazelluläre Wirksamkeit von AFN in Kombination mit Rifampicin (Rif), Lysostaphin (Lys) und Mupirocin (Mup) zu bewerten, wurden Saos-2-Zellen mit dem Stamm *S. aureus* USA300 bei einem MOI von 100 infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit den Medikamenten behandelt. Die Konzentration von AFN wurde während der gesamten Versuche bei 2 µg/ml gehalten. 24 Stunden nach der Behandlung wurde die intrazelluläre Belastung durch Lyse des Wirts und CFU-Zählung erfasst.

In **(Abb. 5a)** wurde bei der Behandlung mit Mup oder Lys keine signifikante Verringerung der intrazellulären Bakterienlast beobachtet. Da Lys derzeit nicht klinisch eingesetzt wird und Mup in erster Linie für topische Anwendungen zugelassen ist, haben diese Ergebnisse unsere Entscheidung beeinflusst, uns in nachfolgenden Studien auf Rif zu konzentrieren, ein weit verbreitetes und klinisch relevantes Antibiotikum zur Behandlung von Staphylokokkeninfektionen. **(Abb. 5b)** zeigt, dass die Behandlung mit AFN allein zu einer moderaten Verringerung der intrazellulären KBE im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen führte.

Wie in **(Abb. 5c)** gezeigt, führte die Behandlung mit AFN allein zu einer moderaten Verringerung der intrazellulären CFU im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die Monotherapie mit Rif in steigenden Konzentrationen von 0,15 bis 1,25 µg/ml führte zu einer dosisabhängigen Verringerung der bakteriellen Belastung. Bemerkenswert ist, dass die Kombinationstherapie mit AFN und Rif im Vergleich zur Monotherapie keine große Verringerung der intrazellulären Bakterienlast zeigte. Dieser Effekt wurde auch bei höheren Medikamentendosen bestätigt **(Abb. 5c)**. **Die intrazelluläre Bakterienlast wurde bei solchen hohen Dosen von Rif (5 µg/ml–10 µg/ml) reduziert, jedoch konnten wir keinen zusätzlichen Nutzen der Doppelbehandlung gegenüber der Monotherapie feststellen.**

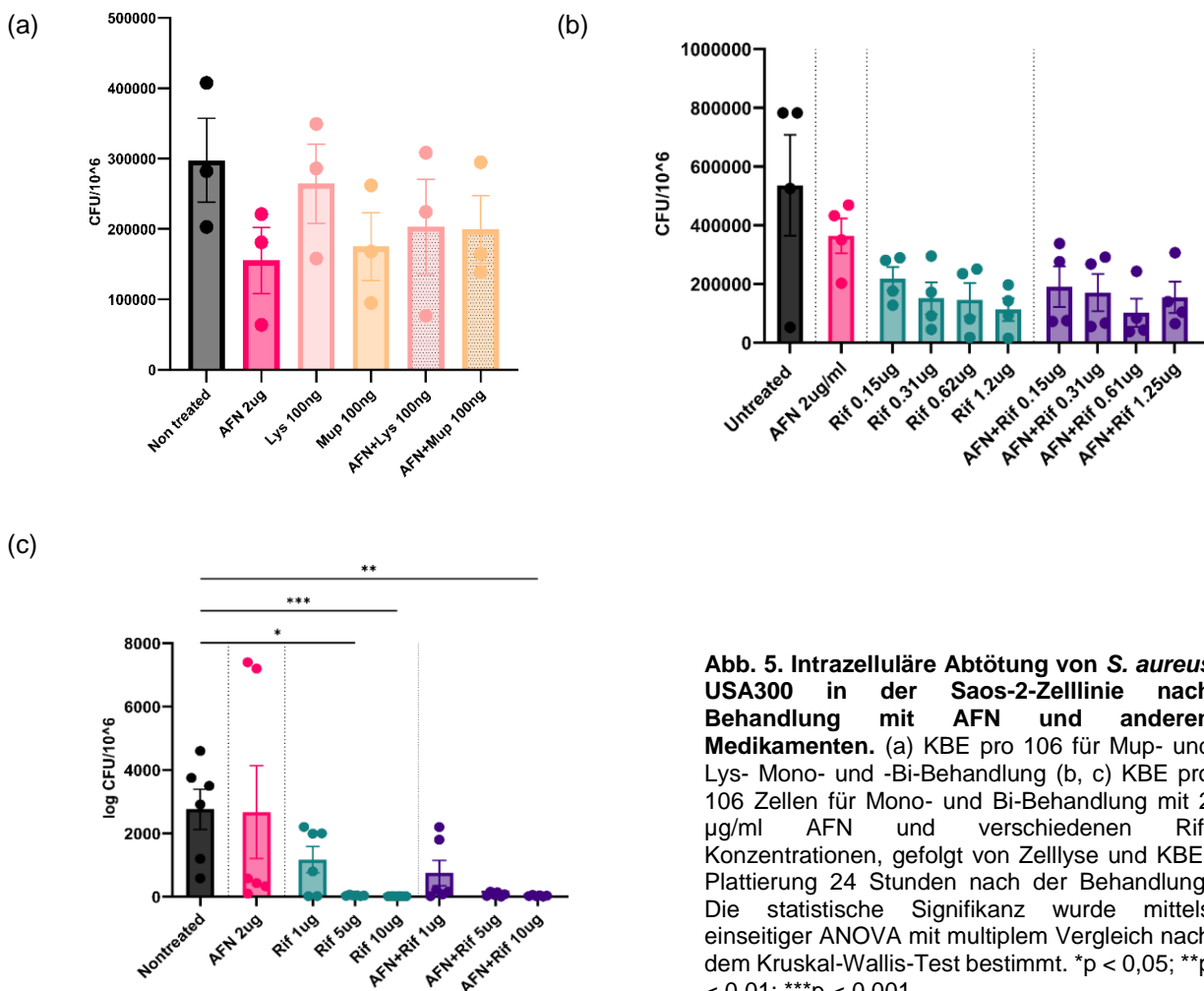


Abb. 5. Intrazelluläre Abtötung von *S. aureus* USA300 in der Saos-2-Zelllinie nach Behandlung mit AFN und anderen Medikamenten. (a) KBE pro 10⁶ für Mup- und Lys- Mono- und -Bi-Behandlung (b, c) KBE pro 10⁶ Zellen für Mono- und Bi-Behandlung mit 2 µg/ml AFN und verschiedenen Rif-Konzentrationen, gefolgt von Zellyse und KBE-Plattierung 24 Stunden nach der Behandlung. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit multiplem Vergleich nach dem Kruskal-Wallis-Test bestimmt. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Lebensfähigkeit der Wirtszellen und Sicherheitsprofil

Um festzustellen, ob die im intrazellulären Infektionsmodell verwendete Antibiotikabehandlung eine Zytotoxizität im Wirt induzierte, wurden Saos-2-Zellen 24 Stunden nach der Infektion 2 µg/ml AFN und verschiedenen Konzentrationen von Rif (1 µg–10 µg/ml) ausgesetzt, die auch im intrazellulären Behandlungsexperiment zur Bestimmung der CFU verwendet wurden. Die Zytotoxizität wurde mittels PI-Färbung durch Durchflusszytometrie bewertet. **Abb. 6** zeigt eine Gesamtzytotoxizität von weniger als 10 % für alle Fälle, was auf die Erhaltung der Integrität der Wirtszellen hinweist. AFN allein oder in Kombination mit Rif verstärkte die Zytotoxizität im Vergleich zu Rif oder unbehandelten Proben nicht, was darauf hindeutet, dass die medikamentöse Behandlung unter den getesteten Bedingungen nicht zytotoxisch ist.

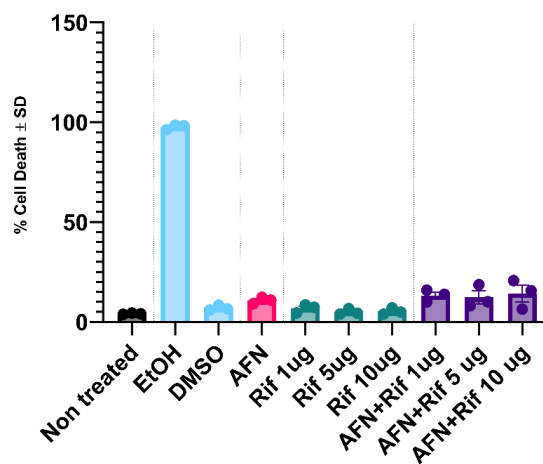


Abb. 6. Zytotoxizität der Antibiotikabehandlung in mit *S. aureus* infizierten Saos-2- Zellen, gemessen anhand der PI-Aufnahme. Saos-2-Zellen wurden mit dem Stamm USA300 bei einem MOI von 100 infiziert und 24 Stunden nach der Infektion mit AFN (2 µg/ml) und Rif (1 µg/ml-10 µg/ml) oder einer Kombination aus beiden in einer Doppelbehandlung behandelt. Nach 24 Stunden Behandlung wurden die Zellen mit PI angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Balken stellen den Mittelwert ± SD der nicht lebensfähigen Zellen dar. Die mit Antibiotika behandelte Gruppe zeigt im Vergleich zu den unbehandelten Proben keine deutlich erhöhte Zytotoxizität, die auf die medikamentöse Behandlung zurückzuführen ist. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit anschließendem Kruskal- Wallis-Test für multiple Vergleiche bestimmt. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Wirksamkeit von Liposomenformulierungen

Um zu untersuchen, ob die liposomale Verkapselung die intrazelluläre Antibiotikaeffizienz verbessert, wurden Saos-2-Zellen mit USA300 bei einem MOI von 100 infiziert und anschließend mit freien oder verkapselten Wirkstoffen (F2) allein und in Kombination behandelt. Die Zellysate wurden 24 Stunden nach der Behandlung ausplattiert und die CFU notiert. (**Abb. 7a, b**) zeigen eine Verringerung der intrazellulären CFU im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei ähnlicher oder leicht verbesserter Wirksamkeit. Ähnliche Experimente mit Mup und Lys (**Abb. 7c**) konnten nicht fortgesetzt werden, da die Liposomenformulierungen weiter optimiert und Kontaminationsprobleme bei den von unserem Unternehmenspartner gelieferten Liposomen behoben werden mussten.

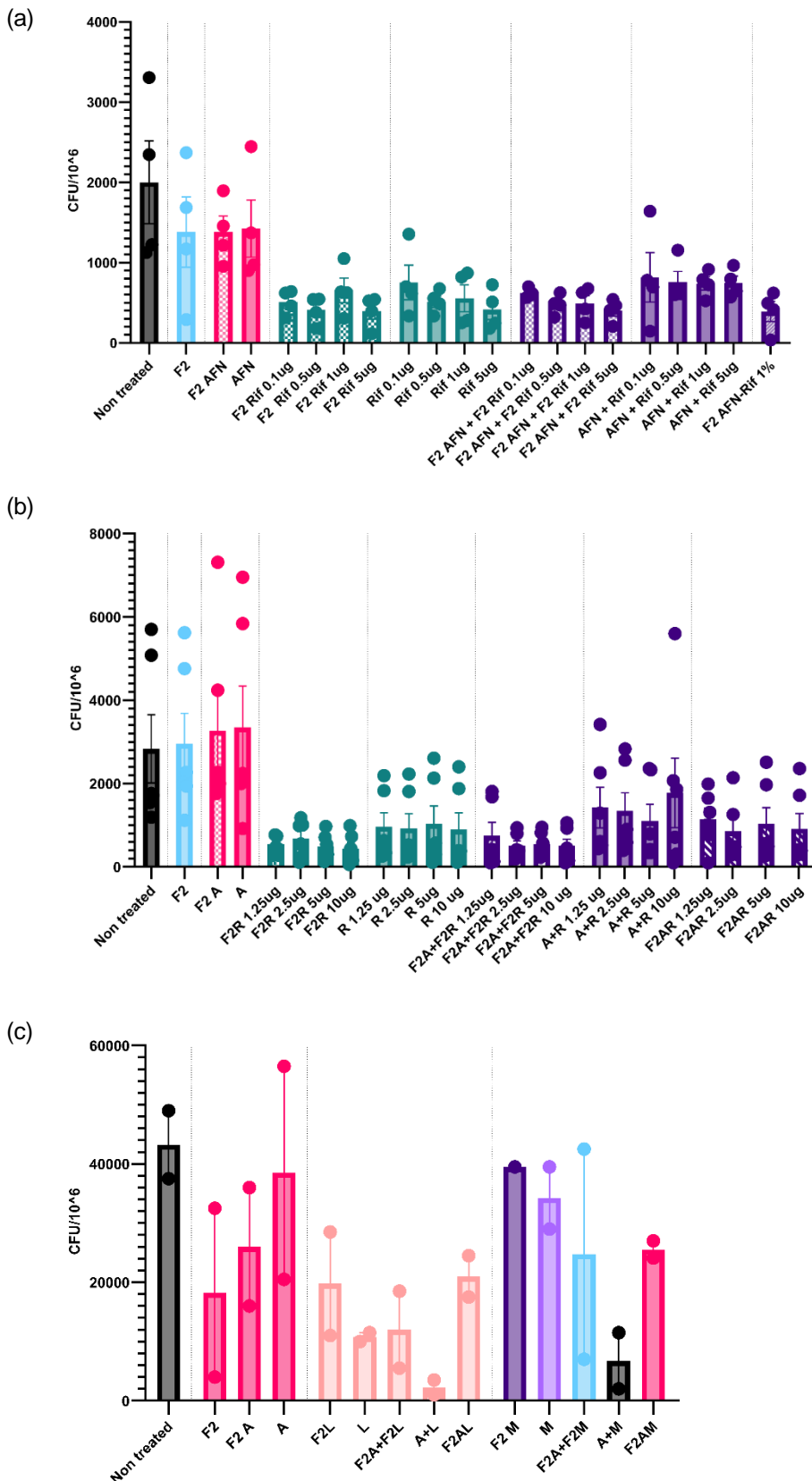


Abb. 7. Intrazelluläre antibakterielle Aktivität von freien und eingekapselten Antibiotika in Saos-2-Zellen, die mit USA300 infiziert sind. Freies Medikament: AFN, Rif, Mup, Lys eingekapselte Medikamente: F2-AFN, F2-Rif, F2-Mup, F2-Lys (einzeln eingekapselte Medikamente); F2-AFN + F2-Rif, F2-AFN+F2-Mup, F2-AFN+F2Lys (Kombination einzeln eingekapselter Medikamente); F2-(AFN+Rif), F2-(AFN+Mup), F2-(AFN+Lys) (gemeinsam eingekapselte Arzneimittelformulierung) und unbehandelte Kontrolle. **(a,b)** KBE pro 106 Zellen nach Zellyse. Sowohl einzeln eingekapselte als auch gemeinsam eingekapselte Arzneimittel zeigten eine ähnliche Wirkung wie die nicht eingekapselten Arzneimittel. Es wurde zwar eine Verringerung der KBE beobachtet, diese war jedoch statistisch nicht signifikant. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit anschließendem Kruskal-Wallis-Test für multiple Vergleiche bestimmt. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Diskussion

In dieser Studie wurde eine kombinierte Antibiotikabehandlung gegen intrazellulär persistente *S. aureus* unter Verwendung der menschlichen Osteoblastenzelllinie untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass AFN *in vitro* wirksam ist und eine niedrige MHK gegen planktonische Bakterien aufweist. Selbst bei einer sehr geringen Konzentration des Wirkstoffs wurde kein sichtbares Wachstum im Medium beobachtet; die Ausplattung des Mediums ergab jedoch überlebende Bakterien, was darauf hindeutet, dass einige Bakterien trotz fehlendem sichtbarem Wachstum persistieren. Bei AFN wurde eine dosisabhängige abtötende Wirkung beobachtet, die bei 2 µg/ml ihren Höhepunkt erreichte und zu der größten Reduktion lebensfähiger Bakterien führte; daher wurde diese Konzentration in den nachfolgenden Experimenten verwendet.

Die Behandlung mit Lys und Mup führte im Vergleich zur unbehandelten Probe zu keiner signifikanten Verringerung der intrazellulären Bakterienlast. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der vorhandenen Literatur, die zeigt, dass Lys nicht in der Lage ist, die intrazelluläre Zellmembran wirksam zu durchdringen, was seine Aktivität gegen intrazelluläre Bakterien einschränkt (Wang et al., 2018). In ähnlicher Weise zeigt Mup eine minimale Verringerung der Bakterienzahl, was aufgrund seiner begrenzten Wirksamkeit gegen intrazelluläre Bakterien bereits zuvor untersucht wurde (J Rigaiil et al., 2018).

Die Studie von Tuchscher et al. (2016) zeigte, dass *S. aureus* seine Resistenz gegen Antibiotika während einer chronischen Osteomyelitis durch die Bildung dynamischer kleiner Kolonievarianten (SCVs) erhöht, die intrazellulär persistieren und therapeutische Behandlungen überleben können, die *in vitro* normalerweise wirksam sind. Von allen in ihren Zellkultur- und Tiermodellen getesteten Antibiotika reduzierte nur Rifampicin die intrazelluläre Bakterienlast signifikant und war sowohl im akuten als auch im chronischen Stadium der Infektion wirksam. Andere häufig verwendete Antibiotika verloren entweder ihre Wirksamkeit gegen intrazelluläre Persister oder förderten sogar die SCV-Bildung, was möglicherweise zur Chronifizierung und zum Rückfall beitrug. Angesichts dieser Ergebnisse und der überlegenen Wirksamkeit von Rifampicin, die in ihren chronischen Infektionsmodellen berichtet wurde, beschlossen wir, unsere Hauptexperimente auf die Bewertung von Rifampicin zu konzentrieren, sowohl als Einzelwirkstoff als auch in Kombination, um intrazelluläre *S. aureus* zu bekämpfen. Dieser Ansatz zielt darauf ab, auf der nachgewiesenen Fähigkeit von Rifampicin aufzubauen, persistente Bakterienpopulationen in Osteoblastenzellen zu beseitigen, und Strategien zu entwickeln, mit denen die mit SCV verbundenen Herausforderungen überwunden werden können.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde beschlossen, sich stärker auf das klinisch verwendete Medikament Rif zu konzentrieren, um eine bessere bakterielle Clearance zu erreichen und das Problem der Resistenz durch eine Doppelbehandlung anzugehen. Ähnlich verhielt es sich mit den gekapselten Arzneimittelformulierungen: Leider schränkten die laufenden Optimierungsbemühungen unserer Kooperationspartner und der Erhalt kontaminierter Arzneimittelproben unsere Möglichkeiten ein, zusätzliche Replikate für diese Experimente herzustellen.

Rifampicin allein zeigte ebenfalls eine starke Aktivität und erzielte in diesem Test eine signifikante Reduktion der KBE und eine vollständige Ausrottung bei 10 µg/ml. Bemerkenswert ist, dass die Doppelbehandlung in der Planktonkultur eine additive antimikrobielle Wirkung bei einer niedrigeren Konzentration erzielte. Bei höheren Konzentrationen wurde kein zusätzlicher Nutzen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass AFN die Rif-Aktivität gegen wachsende *S. aureus* unter extrazellulären Bedingungen selbst bei sehr niedrigen Konzentrationen verstärken kann. Diese *in-vitro*-Ergebnisse stimmen weitgehend mit der Literatur zur Kombinationstherapie überein, die im Allgemeinen die bakterizide Aktivität verbessert oder zur Unterdrückung der Resistenzentwicklung beiträgt (Francesc Escrihuela-Vidal et al., 2025; Nakamura et al., 2025). Dies war jedoch bei intrazellulären Infektionen in den Zellkulturexperimenten nicht erkennbar. In der infizierten menschlichen Osteoblastenzelllinie Saos-2 führte die Behandlung mit Rif allein zu einer dosisabhängigen Verringerung der intrazellulären Bakterienlast; die zusätzliche Verabreichung von AFN verstärkte die Clearance nicht. Ebenso konnte

die intrazelluläre Wirksamkeit des Wirkstoffs durch die Einbindung der Wirkstoffe in liposomale Nanotransporter im Vergleich zum freien Wirkstoff nicht verbessert werden. Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse den Unterschied zwischen extrazellulären und intrazellulären Ergebnissen und verdeutlichen die Herausforderungen bei der Ausrottung von *S. aureus* in der geschützten intrazellulären Nische.

Die mangelnde Effizienzsteigerung von AFN-1252 in Kombination mit Rifampicin und anderen Antibiotika innerhalb der Wirtszellen trotz ihrer additiven Wirkung im Medium kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. (i) Die intrazelluläre Umgebung ermöglicht es den Bakterien, SCV mit verlangsamtem Stoffwechsel und veränderter Physiologie sowie erhöhter Antibiotikaresistenz zu bilden. In unserem Modell führte AFN allein zu einer moderaten Verringerung der CFU im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen; dies steht im Einklang mit Studien, die zeigen, dass Fettsäuresynthesehemmer weniger wirksam sind, wenn der Stoffwechsel der Bakterien verlangsamt ist. Die SCVs haben einen geringeren Bedarf an Fettsäurebiosynthese, was den AFN-Mechanismus intrazellulär möglicherweise weniger wirksam macht (Morvan et al., 2016; Bazaid et al., 2018). (ii) Aus dem Wirt stammende Fettsäuren können es *S. aureus* ermöglichen, den Fettsäurebiosyntheseweg (FASII), das Ziel von AFN-1252, zu umgehen. Eine Fülle von Fettsäuren im Medium (z. B. Serum) kann es den Bakterien ermöglichen, die exogenen Umweltlipide aufzunehmen und in ihre Membran einzubauen. Dies führt auf natürliche Weise zu einer metabolischen Umgehung, selbst wenn FabI gehemmt ist, da die Bakterien die Fettsäuren des Wirts zur Aufrechterhaltung der Membransynthese nutzen (Pruitt et al., 2023). Studien zeigen, dass die Exposition gegenüber externen Fettsäuren zu einer schnellen Anpassung und der Entstehung einer Resistenz gegen FabI-Inhibitoren führt, ohne dass Mutationen an der Zielstelle erforderlich sind. **Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese aufgestellt, dass *S. aureus* die Fettsäuren des Wirts nutzen kann, wodurch die Abhängigkeit von der Fettsäuresynthese verringert und die Wirkung von AFN-1252 aufgehoben wird.** Dies könnte erklären, warum die Kombination von Rifampicin und AFN innerhalb der Wirtszellen keine bessere Abtötungswirkung zeigt als Rifampicin allein (Frank et al., 2020). (iii) Die Penetration und Verteilung von Antibiotika könnte eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung intrazellulärer Bakterien spielen. Rifampicin ist stark lipophil und kann effizient in die eukaryotische Zellmembran eindringen (Tanner et al., 2021). Andererseits wurde auch berichtet, dass AFN frei in Phagozyten eindringen kann. Die Studie legt nahe, dass die intrazelluläre Wirksamkeit von Rif bei den höchsten Dosen deutlich reduziert war, während AFN im getesteten Zeitrahmen nur minimale zusätzliche Wirkungen zeigte. Die bakterizide Wirkung von Rif gegen *S. aureus* wird durch die statische Wirkung von AFN überschattet. Wenn AFN in die Wirtszellen eindringt, verlangsamt es zwar das Bakterienwachstum oder induziert Stress, aber dies reicht möglicherweise nicht aus, um über die Wirkung von Rif hinaus zu steigern.

In den planktonischen Kulturen vermehrten sich die Bakterien im Gegensatz zum intrazellulären Modell aktiv und waren auf FASII angewiesen, sodass die Unterbrechung der Fettsäuresynthese mit AFN eine deutlichere Wirkung hat, die durch die abtötende Wirkung von Rif noch verstärkt wird. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die MHK-Tests und Experimente mit der planktonischen Kultur möglicherweise nicht in der Lage sind, die Anpassungsstrategien von *S. aureus* zu erfassen. Schließlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Synergie *in-vitro* keine intrazelluläre Abtötung garantiert, was die Bedeutung von Antibiotikatests unter Wirtsbedingungen unterstreicht.

Daraufhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Verkapselung von AFN und Rifampicin in Liposomen den Transport zu den Osteoblasten verbessern und die intrazelluläre antibakterielle Wirkung verstärken könnte. Liposomen-Träger können möglicherweise die Aufnahme des Antibiotikums durch die Wirtszellen erleichtern und das Medikament vor dem Abbau schützen, während sie gleichzeitig die Freisetzung des Medikaments modulieren (Wang et al., 2023). **In der Studie führte die liposomale Verkapselung jedoch zu keiner statistisch signifikanten Verbesserung der intrazellulären Clearance im Vergleich zum freien Medikament.** Sowohl freies als auch liposomales AFN und Rif reduzieren die intrazelluläre CFU in ähnlichem Maße. Dafür könnte es verschiedene Erklärungen geben (i) Osteoblasten sind keine professionellen Phagozyten, und ihre Fähigkeit, Liposomen aus dem Medium aufzunehmen, ist im Vergleich zu Makrophagen möglicherweise begrenzt (Gandek et al., 2023). Möglicherweise drang in unserem Versuchsaufbau freies Rif aufgrund seiner Permeabilität schnell in die Osteoblasten ein und entfaltete dort seine Wirkung, während das

eingekapselte Rif möglicherweise erst aufgenommen und aus den Endosomen freigesetzt werden musste, wodurch es keinen Zeitvorteil bot.

Es ist zu beachten, dass für die Infektionsexperimente eine einzige aus Osteosarkomen gewonnene Zelllinie (Saos-2) verwendet wurde. Obwohl die Zelllinie gut etabliert ist, spiegelt sie möglicherweise nicht perfekt das Verhalten der primären Knochenzellen bei den Patienten wider. Darüber hinaus handelt es sich bei dem verwendeten intrazellulären Infektionssystem um ein reines Zellkulturmodell, sodass der Einfluss des Immunsystems des Wirts, das zur Beseitigung von Bakterien oder zur Wechselwirkung mit Antibiotika beitragen kann, außer Acht gelassen wird. Außerdem sind die von den Unternehmenspartnern bereitgestellten liposomalen Medikamente möglicherweise nicht vollständig für die Bekämpfung der intrazellulären Knocheninfektion optimiert. In Zukunft könnten verschiedene liposomale Designs getestet werden, um die Verabreichung und Beseitigung zu verbessern.

Die aus diesem Projekt erzielten Ergebnisse wurden den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Aktuell sind sie noch nicht publiziert. Eine gemeinsame Veröffentlichung ist geplant, wenn die Ergebnisse der Partner vorliegen.

References

- Bazaid, A. S., Forbes, S., Humphreys, G. J., Ledder, R. G., O’Cualain, R., & McBain, J. (2018). Fatty Acid Supplementation Reverses the Small Colony Variant Phenotype in Triclosan-Adapted *Staphylococcus aureus*: Genetic, Proteomic and Phenotypic Analyses. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21925-6>
- Cai, Y., Huang, C., Chen, X., Chen, Y., Huang, Z., Zhang, C., Zhang, W., & Fang, X. (2022). The role of *Staphylococcus aureus* small colony variants in intraosseous invasion and colonization in periprosthetic joint infection. *Bone & Joint Research*, 11(12), 843–853. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.1112.bjr-2021-0590.r1>
- Collet, Q., Velard, F., Laurent, F., & Josse, J. (2025). Intracellular *Staphylococcus aureus* in osteoblasts and osteocytes and its impact on bone homeostasis during osteomyelitis. *Bone*, 198, 117536. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2025.117536>
- El Zein, S., Berbari, E. F., Passerini, M., Petri, F., Maamari, J., Murad, M. H., Sendi, P., & Tande, A. J. (2023). Rifampin Based Therapy for Patients With *Staphylococcus aureus* Native Vertebral Osteomyelitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 78(1), 40–47. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad560>
- Ferreira, L., Pos, E., Nogueira, D. R., Ferreira, F. P., Sousa, R., & Abreu, M. A. (2024). Antibiotics with antibiofilm activity – rifampicin and beyond. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1435720>
- Ferreira, M., Ogren, M., Dias, J. N. R., Silva, M., Gil, S., Tavares, L., Aires-da-Silva, F., Gaspar, M. M., & Aguiar, S. I. (2021). Liposomes as Antibiotic Delivery Systems: A Promising Nanotechnological Strategy against Antimicrobial Resistance. *Molecules*, 26(7), 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules26072047>
- Ferreira, M., Pinto, S. N., Aires-da-Silva, F., Bettencourt, A., Aguiar, S. I., & Gaspar, M. M. (2021). Liposomes as a Nanoplatfom to Improve the Delivery of Antibiotics into *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Pharmaceutics*, 13(3), 321. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030321>
- Francesc Escrihuela-Vidal, Ong, S. W. X., Oriol, I., Grillo, S., Pujol, M., Natàlia Pallarès, Cristian Tebé, Liu, K., Miró, J. M., Tong, S. Y. C., & Jordi Carratalà. (2025). Adjunctive Fosfomycin for the Treatment of *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Pooled Post-hoc Analysis of Individual Participant Data from Two Randomized Trials. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaf387>
- Frank, M. W., Yao, J., Batte, J. L., Gullett, J. M., Subramanian, C., Rosch, J. W., & Rock, C. O. (2020). Host Fatty Acid Utilization by *Staphylococcus aureus* at the Infection Site. *MBio*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00920-20>

- Gandek, T. B., Luke, & Nagelkerke, A. (2023). A Comparison of Cellular Uptake Mechanisms, Delivery Efficacy, and Intracellular Fate between Liposomes and Extracellular Vesicles. *Advanced Healthcare Materials*. <https://doi.org/10.1002/adhm.202300319>
- Garcia-Moreno, M., Jordan, P. M., Günther, K., Dau, T., Fritsch, C., Vermes, M., Schoppa, A., Ignatius, A., Wildemann, B., Werz, O., Löffler, B., & Tuchscher, L. (2022). Osteocytes Serve as a Reservoir for Intracellular Persisting *Staphylococcus aureus* Due to the Lack of Defense Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.937466>
- Gimza, B. D., & Cassat, J. E. (2021). Mechanisms of Antibiotic Failure During *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.638085>
- Guardabassi, L., Moodley, A., Williams, A., Stegger, M., Damborg, P., Halliday-Simmonds, I., & Butaye, P. (2019). High Prevalence of USA300 Among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on St. Kitts and Nevis, West Indies. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01123>
- Hardie, J., Makabenta, J. M., Gupta, A., Huang, R., Cao-Milán, R., Goswami, R., Zhang, X., Abdulpurkar, P., Farkas, M. E., & Rotello, V. M. (2022). Selective treatment of intracellular bacterial infections using host cell-targeted bioorthogonal nanozymes. *Materials Horizons*, *9*(5), 1489–1494. <https://doi.org/10.1039/d1mh02042k>
- Kalinka, J., Hachmeister, M., Geraci, J., Sordelli, D. O., Hansen, U. J., Niemann, S., Oetermann, S., Peters, G., Löffler, B., & Tuchscher, L. (2014). *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *International Journal of Medical Microbiology*, *304*(8), 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.013>
- Kaplan, N., Albert, M., Awrey, D., Bardouniotis, E., Berman, J., Clarke, T., Dorsey, M., Hafkin, B., Ramnauth, J., Romanov, V., Schmid, M. B., Thalakada, R., Yethon, J., & Pauls, H. W. (2012). Mode of Action, In Vitro Activity, and In Vivo Efficacy of AFN-1252, a Selective Antistaphylococcal FabI Inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(11), 5865–5874. <https://doi.org/10.1128/aac.01411-12>
- Karlowsky, J. A., Kaplan, N., Hafkin, B., Hoban, D. J., & Zhanel, G. G. (2009). AFN-1252, a FabI Inhibitor, Demonstrates a *Staphylococcus*-Specific Spectrum of Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(8), 3544–3548. <https://doi.org/10.1128/aac.00400-09>
- Landersdorfer, C. B., Kinzig, M., Bulitta, J. B., Hennig, F. F., Holzgrabe, U., Sörgel, F., & Gusinde, J. (2009). Bone Penetration of Amoxicillin and Clavulanic Acid Evaluated by Population Pharmacokinetics and Monte Carlo Simulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(6), 2569–2578. <https://doi.org/10.1128/AAC.01119-08>
- Landersdorfer, C. B., Wee Leng Lee, Nation, R. L., David, Kirsty Buising, Peel, T. N., & Peter. (2022). Penetration of Vancomycin into Noninfected Bone in Patients Undergoing Total Joint Arthroplasty Evaluated by a Minimal Physiologically Based Population Pharmacokinetic Modeling Approach. *Molecular Pharmaceutics*, *20*(3), 1509–1518. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00724>
- Mashayamombe, M., Carda-Diéguez, M., Mira, A., Fitridge, R., Zilm, P. S., & Kidd, S. P. (2023). Subpopulations in Strains of *Staphylococcus aureus* Provide Antibiotic Tolerance. *Antibiotics*, *12*(2), 406. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020406>
- Masters, E. A., Muthukrishnan, G., Ho, L., Gill, A. L., de Mesy Bentley, K. L., Galloway, C. A., McGrath, J. L., Awad, H. A., Gill, S. R., & Schwarz, E. M. (2021). *Staphylococcus aureus* Cell Wall Biosynthesis Modulates Bone Invasion and Osteomyelitis Pathogenesis. *Frontier in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.723498>
- Morvan, C., Halpern, D., Gérald Kénanian, Hays, C., Anba-Mondoloni, J., Brinster, S., Kennedy, S. P., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., Gilles Lamberet, Gloux, K., & Gruss, A. (2016). Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials. *Nature Communications*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms12944>
- Nakamura, M., Yoshinori Tomoda, Kobayashi, M., Hideaki Hanaki, & Yuhsaku Kanoh. (2025). Sulfamethoxazole-trimethoprim plus rifampicin combination therapy for methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus infection: An in vitro study. *PLoS ONE*, 20(5), e0323935–e0323935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0323935>
- Nie, B., Huo, S., Qu, X., Guo, J., Liu, X., Hong, Q., Wang, Y., Yang, J., & Yue, B. (2022). Bone infection site targeting nanoparticle-antibiotics delivery vehicle to enhance treatment efficacy of orthopedic implant related infection. *Bioactive Materials*, 16, 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.02.003>
- Pruitt, E. L., Zhang, R., Ross, D. H., Ashford, N. K., Chen, X., Alonzo, F., Bush, M. F., Werth, B. J., & Xu, L. (2023). Elucidating the impact of bacterial lipases, human serum albumin, and FASII inhibition on the utilization of exogenous fatty acids by *Staphylococcus aureus*. *MSphere*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00368-23>
- Rong, Z., Chen, X., Qin, L., Wang, X., Luo, F., Zou, Q., & Zeng, H. (2025). Immune escape of *Staphylococcus aureus* mediated by osteocyte lacuna-canalicular network leads to persistent and uncured bone infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1592086>
- Tanner, L., Mashabela, G. T., Omollo, C. C., Timothy, Parkinson, C. J., Warner, D. F., Haynes, R. K., & Wiesner, L. (2021). Intracellular Accumulation of Novel and Clinically Used TB Drugs Potentiates Intracellular Synergy. *Microbiology Spectrum*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00434-21>
- Tuschscherr, L., Kreis, C., Hoerr, V., Flint, L. D., Hachmeister, M., Geraci, J., Sibylle Bremer-Streck, Kiehntopf, M., Medina, E., M. Kribus, Raschke, M. J., Pletz, M. W., Peters, G., & Löffler, B. (2015). *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(2), 438–448. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv371>
- Tuschscherr, L., Löffler, B., & Proctor, R. A. (2020). Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01028>
- Wang, C., Yang, Y., Cao, Y., Liu, K., Shi, H., Guo, X., Liu, W., Hao, R., Song, H., & Zhao, R. (2023). Nanocarriers for the delivery of antibiotics into cells against intracellular bacterial infection. *Biomaterials Science*, 11(2), 432–444. <https://doi.org/10.1039/D2BM01489K>
- Zelmer, A. R., Nelson, R., Richter, K., & Atkins, G. J. (2022). Can intracellular *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis be treated using current antibiotics? A systematic review and narrative synthesis. *Bone Research*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00227-8>
- Zimmerli, W., & Sendi, P. (2018). Role of Rifampin against Staphylococcal Biofilm Infections In Vitro, in Animal Models, and in Orthopedic-Device-Related Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2), e01746-18. <https://doi.org/10.1128/aac.01746-18>