

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie,
Klinische Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Clozapine-induced agranulocytosis:
Evidence for an immune-mediated mechanism from a patient-specific
in vitro approach

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie Irmelin Luise Herzog
aus Berlin

Datum der Promotion: 2.3.2018

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Eidesstattliche Versicherung	5
Ausführliche Anteilerklärung	6
Auszug aus der Journal Summary List	7
Publikation	8
Lebenslauf	15
Publikationsliste	16
Danksagung	17

Zusammenfassung

Clozapin (CZP), ein atypisches Antipsychotikum, ist ein Medikament der ersten Wahl bei der Behandlung der therapieresistenten Schizophrenie.

Aufgrund der seltenen, aber potentiell lebensbedrohlichen Agranulozytose beziehungsweise Granulozytopenie, die unter der Behandlung mit CZP auftreten kann (CIAG, clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia), ist der Einsatz dennoch zurückhaltend. Die Inzidenz der CIAG liegt zwischen 3 % für eine Granulozytopenie (Granulozyten $< 1500/\text{nl}$ und $> 500/\text{nl}$) und 0,8 % für die Agranulozytose (< 500 Granulozyten/nl).

Derzeit sind die molekularen Ursachen der CIAG zwar noch weitestgehend unbekannt, jedoch gibt es zahlreiche Studien, die Interaktionen zwischen dem Immunsystem und den Nebenwirkungen von CZP vermuten. Zudem gibt es keine funktionellen Tests oder Biomarker, die das patientenspezifische Risiko, eine CIAG unter der Behandlung mit CZP zu entwickeln, detektieren könnten.

Wir nahmen an, dass der CIAG ein immunogener und möglicherweise Hapten-basierter Mechanismus zugrunde liegt und nutzten personalisierte Zellkulturen um unsere Hypothese zu unterstützen.

In unsere Studie schlossen wir insgesamt 24 Individuen ein: sechs Patienten, die in der Vergangenheit von einer CIAG betroffen waren, sechs Patienten unter Clozapintherapie, die keine CIAG entwickelten und zwölf gesunde Kontrollpersonen. Von jedem Individuum wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) separiert, in einem Lymphozyten Stimulations - Assay kultiviert und teilweise mit CZP unterschiedlicher Konzentrationen versetzt. Nach Inkubation wurde die Proliferation der PBMC mit einem colorimetrischen Test gemessen und der Stimulationsindex in Relation zu unstimulierten Zellen und unbehandelten Zellen berechnet.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine in-vitro Exposition der Zellen mit niedrigen Konzentrationen von CZP zu einer signifikant erhöhten Proliferationsrate der PBMC derjenigen Patienten führte, die von einer CIAG betroffen waren, nicht jedoch in den anderen Gruppen.

Bei der Toxizität von CZP auf die PBMC, der Mitogen-induzierten Proliferation sowie den Effekten von CZP auf die Mitogen-induzierte Proliferation zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den CIAG Patienten und den anderen beiden Gruppen.

Die wichtigste Erkenntnis, die durch CZP induzierte und gesteigerte Proliferationsrate der PBMC in der Gruppe der CIAG Patienten unterstützt unsere Annahme einer immunogenen und möglicherweise Hapten-vermittelten Reaktion.

Dieser personalisierte Ansatz war weder für die Charakterisierung der proliferierenden Zellfraktionen, noch für die Einschätzung des Risikos einer CIAG bei Erstkontakt mit CZP konzipiert. Dennoch könnte es ein Ausgangspunkt für zusätzliche Studien zu diesen Aspekten und einer potentiell immunogenen Pathogenese der CIAG sein.

Insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung eines prädikativen Tests, der das patientenspezifische Risiko einer CIAG erkennen kann, könnten unsere Ergebnisse in der Zukunft vielleicht einen Beitrag zur Verbesserung der Patientensicherheit leisten.

Abstract

Clozapine (CZP), an atypical antipsychotic is a first choice medication in treatment of therapy-resistant schizophrenia, but its use is compromised by the risk of potentially life threatening agranulocytosis/granulocytopenia (CIAG). In statistics the incidence for suffering this serious adverse drug reaction ranges between 3 % for milder cases of granulocytopenia (granulocytes $>500/\text{nl}$ and $< 1500/\text{nl}$) and 0,8 % for agranulocytosis (< 500 granulocytes/nl). At present the molecular mechanisms of CIAG are widely unknown, but multiple studies suspected interactions between the immune system and the side effects of clozapine. Furthermore there is no functional test or biomarker available to detect a patient specific risk for development CIAG under CZP treatment. We hypothesized an immunogenic and potentially haptene-based mechanism underlying CIAG pathophysiology and established a simple and personalized cell culture-based strategy to find a hint for our considerations.

A total of 24 individuals were included in our study, six of which with a history of CIAG, six patients under CZP treatment (without CIAG) and twelve matched healthy controls.

From each individual peripheral blood-derived mononuclear cells (PBMC) were separated, cultivated in a traditional lymphocyte stimulation assay and particularly exposed to CZP in different concentrations. After incubation, proliferation of PBMC was measured by a colorimetric assay and analyzed as stimulation index in relation to unstimulated cells and untreated cells.

Our results revealed that in vitro CZP exposure at low levels resulted in significantly increased proliferation rates, but only in PBMC cell cultures of CIAG patients, not in the other groups. Other parameters that were examined included direct toxicity effects of CZP to PBMC cell cultures, the mitogen-induced proliferation and the effects of CZP on mitogen induced proliferation, did not significantly differ between CIAG patients and the other groups. However, the most important finding, the increased CZP-induced proliferation rate in the PBMC of CIAG patients supports our assumption of an immunogenic response, caused by CZP acting as an haptene.

This personalized approach was neither designed to characterize the proliferating fraction of cells, nor to identify the risk of a patient prior to any contact with CZP. Nevertheless it may still

be a starting point for additional studies to that issues and putative immunogenic mechanisms underlying CIAG development.

Particularly with regard to the intention of development a predictive test, detecting the patient - specific risk of CIAG, our findings might contribute to improve the safety of CZP medication in the future.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marie Irmelin Luise Herzog, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Clozapine-induced agranulocytosis: „Evidence for an immune-mediated mechanism from a patient-specific *in-vitro* approach“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Francesca Regen¹, **Irmelin Herzog**¹, Eric Hahn, Claudia Rühl, Nathalie Le Bret, Michael Dettling, Isabella Heuser, Julian Hellmann-Regen, Clozapine-induced agranulocytosis: Evidence for an immune-mediated mechanism from a patient-specific *in vitro approach*, Toxicology and Applied Pharmacology 316 (2017) 10-16

¹ geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen :

- Mithilfe bei der Formulierung von geeigneten Fragestellungen sowie Literaturrecherche
- Recherche und Durchsicht von Patientenakten
- Identifizierung und Kontaktieren der geeigneten Patienten sowie Organisation von Aufklärung und Blutentnahme der Patienten
- Aufarbeitung der Blutproben, Anlage der Zellkulturen und Messung der Proliferation
- Mitwirkung bei der Ergebnisanalyse und statistischen Auswertung
- Beteiligung bei der Erstellung des Erstmanuskriptes und der Überarbeitung

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2015 Selected Editions: SCIE,SSCI Selected Categories: 'PHARMACOLOGY%20%26%20PHARMACY' Selected Category Scheme: WoS

Platz 48 von 255 Journals in der Kategorie "Pharmacology and Pharmacy"

41	International Journal of Nanomedicine	10,929	4.320	0.025440
42	INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS	9,051	4.097	0.019020
43	CNS Neuroscience & Therapeutics	2,194	4.019	0.007660
44	INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS	38,726	3.994	0.043030
45	EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS	12,572	3.975	0.016030
46	MOLECULAR PHARMACOLOGY	19,494	3.931	0.019500
47	Journal of Neuroimmune Pharmacology	1,847	3.896	0.005040
48	TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY	17,689	3.847	0.023870
49	BRITISH JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY	10,799	3.830	0.017060
50	AAPS Journal	4,077	3.819	0.008280
51	TOXICOLOGY	12,870	3.817	0.014620
52	PHARMACOGENOMICS JOURNAL	2,287	3.784	0.005200
53	EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES	9,540	3.773	0.013600
54	JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS	31,361	3.760	0.028920
55	Current Neuropharmacology	1,606	3.753	0.003400
56	International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance	402	3.746	0.001980
57	JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS	21,811	3.662	0.023920
58	JOURNAL OF PSYCHOPHARMACOLOGY	5,017	3.637	0.012340

Clozapine-induced agranulocytosis: Evidence for an immune-mediated mechanism from a patient-specific in vitro approach, *Toxicology and Applied Pharmacology* 316 (2017) 10-16

Francesca Regen¹, Irmelin Herzog¹, Eric Hahn, Claudia Rühl, Nathalie Le Bret, Michael Dettling, Isabella Heuser, Julian Hellmann-Regen,
1 geteilte Erstautorenschaft

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.12.003>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Regen F *, **Herzog I** *, Hahn, E, Ruehl C, Le Bret N, Dettling M, Heuser I, Hellmann-Regen J ,
Clozapine-induced agranulocytosis: Evidence for an immune-mediated mechanism from a
patient-specific *in vitro* approach, *Toxico Appl Pharmacol.* 2017, Feb 1; 316:10-16

* These two authors contributed equally to this work

Impact factor 3,847

Regen F, Hildebrand M, Le Bret N, **Herzog I**, Heuser I, Hellmann-Regen J

Inhibition of retinoic acid catabolism by minocycline : evidence for a novel mode of action?

Exp Dermatol. 2015 Jun;24(6):473-6

Impact factor 2,675

Hellmann-Regen J, **Herzog I**, Fischer N, Heuser I, Regen F.

Do tetracyclines and erythromycin exert anti-acne effects by inhibition of P450-mediated
degradation of retinoic acid? *Exp Dermatol.* 2014 Apr;23(4):290-3.

Impact factor 3,762

Regen F, Heuser I, **Herzog I**, Hellmann-Regen J.

Striking growth-inhibitory effects of minocycline on human prostate cancer cell lines.

Urology. 2014 Feb;83(2):509.e1-6.

Impact factor 1,091

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Betreuern Frau Prof. Dr. Isabella Heuser und Herrn Dr. Julian Hellmann-Regen bedanken. Herr Dr. Hellmann-Regen hat mir mit seiner Begeisterung für die Forschung auf dem Gebiet der psychiatrischen Neurobiologie, seinem Engagement und seinen zahlreichen Ideen die Durchführung meiner Arbeit ermöglicht und mich in jeder Phase unterstützt.

Dem Laborteam um die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Hellmann-Regen, insbesondere Frau Regina Hill, Meike Terborg, Rita Benz und Natalie Le Bret verdanke ich eine sehr lehrreiche und spannende Einarbeitung und Hilfestellung bei meinen Versuchen.

Auch den Mitarbeitern der Klinik für Psychiatrie und der Ambulanz für schizoaffektive Störungen, dessen Standort sich zu dieser Zeit noch in der Eschenallee befand, möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Sie haben mir bei der aufwendigen Suche geeigneter Patienten und bei den Blutabnahmen stets mit Rat und Tat beiseite gestanden.

In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei den Patienten und allen gesunden Studienteilnehmern bedanken, ohne die viele wissenschaftlichen Untersuchungen nicht möglich wären.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. Francesca Regen für die schöne und konstruktive Zusammenarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich zuletzt noch bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich zu jeder Zeit in allen Lebensbereichen unterstützt und motiviert haben.