

University of Groningen

MIF-CD74 interaction as a promising target in drug discovery

Go, Tjie Kok

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Go, T. K. (2019). MIF-CD74 interaction as a promising target in drug discovery. [Groningen]: University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 6

Summary and future perspectives

Summary

MIF is a cytokine that plays a key role in innate and adaptive immune responses. Its activity has been associated with the development of multiple inflammatory diseases and cancer. MIF exerts its biological functions through the interaction with its cellular receptors such as CD74. Hence, MIF-CD74 binding is considered to be a promising target in the development of therapeutics for MIF cytokine-related diseases. We aim to improve the production of the purified CD74 protein in bacteria in order to provide a suitable MIF-CD74 binding assay. Furthermore, we aim to develop novel MIF inhibitors.

Chapter 1 provides the introduction and scope of the thesis. In **Chapter 2**, we provide an overview on the described role of MIF in the pathogenesis of inflammatory diseases and cancer, and on the emerging classes and types of small-molecule inhibitors targeting MIF activity as potential therapeutics for immune disorders. MIF was reported to be associated with acute and chronic inflammatory diseases such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), rheumatoid arthritis, sepsis, diabetes, atherosclerosis and cardiovascular diseases. In addition, many studies described MIF as a biomarker for multiple diseases with an inflammatory component, such as systemic infections and sepsis, cancer, autoimmune diseases and different metabolic disorders. Taken together, these studies demonstrate the essential role of MIF in immune-related diseases. Consequently, many efforts have been taken over the past few years to discover MIF-directed therapeutics. One line of the efforts is the development of biologicals, for instance anti-MIF antibodies. The other line is the development of small-molecule MIF inhibitors aiming at interfering with MIF cytokine activity. This interference can be due to the binding-induced conformational changes of MIF and/or disruption of MIF-CD74 interaction. Compared with biologicals, small-molecule MIF inhibitors offer advantages such as lower manufacturing costs, non-immunogenicity and the possibility of oral administration. Hence, this route of exploration gained tremendous interest.

Targeting MIF tautomerase activity remains a convenient and efficient approach to develop small-molecule MIF inhibitors. In this chapter, we present the

currently identified classes and types of MIF small-molecule inhibitors in two tables. In Table 1 on page 27, the inhibitors with a phenol functionality as the key structural group that presumably interacts with the active site residue Asn-97 of MIF are shown. In Table 2 on page 28, the covalent inhibitors and inhibitors with other structures are presented. We also discuss their structure-activity relationships and new lines of development. In this perspective, we note that the evaluation of the functional consequences on MIF cytokine activity upon treatment with MIF inhibitors is highly important.

This chapter also describes D-DT (MIF2) as a protein that is suggested to have an overlapping functional spectrum with MIF due to its marked homology. Therefore, D-DT should be taken into consideration in the evaluation of MIF cytokine activities and in the development of small molecule MIF inhibitors. Moreover, post-translational modification of MIF that can affect its biological functions has also been reported. MIF has a CXXC motif that can be oxidized to an intramolecular disulfide-bond. Although this redox behavior could interfere with the binding of small molecules, the structural and functional implications for MIF binding remain to be elucidated.

Taken together, Chapter 2 provides an overview on the pivotal role of MIF in inflammatory diseases and cancer, and on the increasing efforts to develop MIF-directed therapeutics from small-molecule inhibitors.

Chapter 3 reports high-yield production and purification of the functional extracellular CD74 proteins using two solubility enhancing peptides. The MIF-CD74 binding was shown *in vitro* to be located in the extracellular moiety of CD74, but the unstable and protease-prone character of this moiety has hampered further characterisation. Attempts to produce the moiety in bacteria provided low yields of soluble protein. We tackled this problem by fusing it to MBP and Fh8 peptides. We put a factor Xa cleavage site on the MBP-CD74 fusion protein and a 3C cleavage site on the Fh8-CD74 fusion protein. After expression, the MBP and Fh8 peptides were removed from the fusion proteins by cleavage with factor Xa and 3C proteases. Following the cleavage, we purified the CD74 cleavage products. However, this effort did not give its full fruits, because the expected CD74 cleavage products were accompanied by further degradation products and the subsequent purification was problematic.

MIF-binding assays showed that all the CD74 fusion proteins and CD74 cleavage products, except sssCD74 that lacks amino acids 77-125, are functional. Due to the purity issue of the functional CD74 cleavage products, the MBP-sCD74 and Fh8-ssCD74 fusion proteins were used in further binding assays for the determination of EC_{50} and/or K_D . The dose-dependent ELISA showed an EC_{50} -

value of around 110 nM for MBP-sCD74 and 280 nM for Fh8-ssCD74. The ITC binding assay demonstrated a K_D -value of around 1.3 μ M for MBP-sCD74. We did not measure the K_D -value of Fh8-ssCD74, because the reaction enthalpy in ITC experimentation was low. This made obtaining solid binding data via ITC difficult. Size exclusion chromatography indicated that all the purified CD74 proteins are mostly present in their homotrimeric form, which is the native form of CD74 proteins.

Furthermore, the ELISA binding experimentation with different CD74 constructs showed that removal of amino acids 77-112 from CD74 (in Fh8-ssCD74 construct) is influencing but not destructing the MIF-binding. This suggests that the amino acids 113-125 of CD74 are involved in the interaction with MIF. In addition, the deletion of amino acids 77-125 (in sssCD74 construct) resulted in the lack of MIF-binding. This implies that the extracellular CD74 trimerisation domain is not or only slightly involved in the binding to MIF, and hence it does not give sufficient response in the binding assays.

In **Chapter 4**, we investigate a diversely-substituted collection of compounds with a chromene scaffold that was synthesized using versatile cyanoacetamide chemistry. The substitution-oriented screening (SOS) for inhibition on MIF tautomerase activity resulted in several hit compounds with IC_{50} 's in the low micromolar range. Preincubation and dilution assays indicated that the inhibitors bind to MIF reversibly. Enzyme kinetic analysis of the most potent inhibitor showed that the inhibitor does not bind in direct competition with the substrate 4-HPP.

Chapter 5 describes the synthesis of a structure-based-designed compounds with isoxazole, benzoxazole and triazole-phenol scaffolds using known synthesis routes. Various substituents were put at specific positions on the scaffolds. The compounds were then assessed for their inhibition on MIF tautomerase activity and their structure-activity relationships was evaluated. This effort has successfully provided several MIF inhibitors with triazole-phenol scaffold with IC_{50} 's in the micromolar range. In addition, we suggest that the triazole-phenol is a promising scaffold for systematic cycles of design and synthesis to elucidate the structure-activity relationship in MIF binding and, ultimately, for the development of potent inhibitors targeting MIF-CD74 binding.

Future perspectives

MIF has been reported as a cytokine that plays a key role in the progression of inflammatory diseases and cancer. Small-molecule inhibitors have been developed and applied to study the role of MIF in immune-related diseases. In addition to ISO-1, that is widely used as a reference compound, other small-molecule inhibitors that were identified in a MIF tautomerase assay also showed positive effects in various disease models. The isoxazolines and 1,2,3-triazoles are two important classes of compounds from which potent MIF inhibitors have been developed. Taken together, these signify the potential of MIF inhibitors in the development of novel therapeutics for inflammatory diseases and cancer.

Concerning the development of MIF inhibitors, it should be noted that the sigmoidal enzyme kinetics and covalent or slow-tight binding behavior can result in overestimation of the inhibitor potency in the MIF tautomerase assay. These issues complicate the analysis of MIF binding. In this perspective, we propose to anticipate on these issues by conducting preincubation and dilution experiments as well as enzyme kinetic studies. The identification of potent MIF inhibitors with favorable properties will enable the development of novel therapeutics for MIF cytokine-related diseases.

Attention should be given toward the MIF homolog D-DT, which has been suggested to have an overlapping functional spectrum with MIF. This implies that a combined therapeutic targeting of MIF and D-DT could bring a synergistic effect. However, further details need to be elucidated.

Also, MIF post-translational modifications including modifications related to redox behavior could interfere with binding of small-molecule inhibitors. This represents an interesting novel line of investigation.

The MIF-CD74 binding assays showed that the CD74 region comprising at least amino acids 113-125 appears to be essential for the interaction with MIF (as described in Chapter 3). This provides useful insight for future work on the construction of functional and stable extracellular CD74 proteins and on the further investigation of a MIF-CD74 binding map.

The identified chromene MIF inhibitors (in Chapter 4) need to be evaluated for their interference with MIF-CD74 interaction in PPI binding assays. Furthermore, their functional consequences to interfere with MIF cytokine-activity need to be investigated in cell-based assays and in relevant disease models.

The identified triazole-phenol MIF inhibitors (Chapter 5) need to be evaluated for their reversibility and kinetic of binding to gain insight in the mode of inhibition. Once the inhibition is confirmed to be reversible and competitive, we can employ the MIF enzymatic pocket to anchor small-molecule inhibitors with

assembled substituents on the triazole ring protruding out of the active site. We anticipate that this construction will interfere with the MIF-CD74 interaction that is described to occur close to the active site. Thus, structure-based design would enable the discovery of inhibitors that can disrupt the MIF-CD74 interaction and potentially provide therapeutics with favorable properties. Further work continuing from Chapter 5 aims at exploring this possibility.

Nederlandse samenvatting

Het eiwit Macrophage Inhibitory Factor (MIF) is een cytokine dat een sleutelrol speelt in signalen van zowel het aangeboren als het verworven immuunsysteem. Zijn activiteit is geassocieerd met tal van ontstekingsziekten en kanker. MIF oefent zijn biologische functie uit door interacties met cellulaire receptoren zoals CD74. Daarom is de binding tussen MIF en CD74 een veelbelovend doelwit voor het ontwikkelen van geneesmiddelen voor MIF-gerelateerde ziekten. Het is ons doel om de productie van gezuiverd CD74 eiwit te verbeteren voor het gebruik in een geschikte bindingstest met MIF. Daarnaast proberen we nieuwe MIF-remmers te ontwikkelen.

Hoofdstuk 1 beschrijft het doel en de reikwijdte van dit proefschrift. In **Hoofdstuk 2** geven we een overzicht van de reeds beschreven rol van MIF in de pathogenese van ontstekingsziekten en kanker, en van het gebruik van de verschillende opkomende klassen van kleine remmers van MIF als medicijn voor immuunziekten. In eerdere studies is reeds gerapporteerd dat MIF geassocieerd is met acute en chronische ontstekingsziekten zoals astma, chronische obstructieve longziekte (COPD), reumatoïde artritis, bloedvergiftiging, kanker, auto-immuunziekten en verschillende stofwisselingsziekten. Samenvattend laten deze studies de essentiële rol zien van MIF in immuun gerelateerde ziekten. Daarom zijn er de laatste jaren veel inspanningen geleverd in het ontdekken van MIF-gerichte medicijnen. Een van de onderzoekslijnen is gericht op het ontwikkelen van biologicals, zoals anti-MIF antilichamen. Een andere onderzoekslijn is gericht op het ontwikkelen van kleine moleculen als remmers die de cytokine activiteit van MIF remmen. Deze remming van cytokine activiteit kan veroorzaakt worden doordat binding van de remmer aan MIF leidt tot een conformationele verandering van MIF en/of doordat de interactie van MIF met CD74 wordt verstoord. In vergelijking met biologicals hebben kleine remmers een aantal voordelen zoals lagere productiekosten, niet-immunogeniciteit en de mogelijkheid van orale toediening. Daarom heeft het ontdekken van kleine remmers grote belangstelling gekregen.

Het richten op de tautomerase activiteit van MIF is nog steeds een gemakkelijke en efficiënte strategie voor het ontwikkelen van kleine MIF remmers. In dit hoofdstuk beschrijven we de bekende klassen en typen van kleine MIF remmers in twee tabellen. In tabel 1, op pagina 27, worden de remmers met een fenol-groep als belangrijkste structurele groep weergegeven, waarvan wordt aangenomen dat deze groep een interactie aangaat met asparagine-97 van MIF. In tabel 2, op pagina 28, worden de covalente remmers en remmers met andere

structurele groepen weergegeven. We bediscussiëren ook de structuur-activiteitsrelatie en nieuwe ontwikkelingen. In dit kader, merken we op dat het erg belangrijk is om het effect van MIF remmers op de cytokine activiteit van MIF te bepalen.

Dit hoofdstuk beschrijft ook D-DT (MIF2) als een eiwit waarvan gesuggereerd is dat het een overlappende functie met MIF heeft vanwege de opvallende homologie met MIF. Daarom zou, bij het bepalen van de cytokine activiteit van MIF en bij het ontwikkelen van kleine remmers van MIF, ook de activiteit van D-DT in overweging moeten worden genomen. Verder zijn er post-translationele modificaties van MIF beschreven die ook een effect kunnen hebben op de biologische functie. MIF heeft een CXXC-motief, dat geoxideerd kan worden tot een intramoleculaire zwavelbrug. Hoewel dit redox gedrag zou kunnen interfereren met de binding van een klein molecuul, moeten de structurele en functionele implicaties daarvan nog worden opgehelderd.

Samenvattend, geeft **hoofdstuk 2** een overzicht van de centrale rol van MIF in ontstekingsziekten en kanker, en de toenemende pogingen om MIF-gerichte medicijnen te ontwikkelen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de productie met hoge opbrengst en de zuivering van functioneel extracellulair CD74 eiwit door gebruik te maken van twee oplosbaarheid-verhogende peptiden. In een *in vitro* experiment werd aangetoond dat de binding van MIF met CD74 plaatsvindt op een extracellulair deel van CD74, maar het onstabiele karakter en de vatbaarheid voor proteasen van CD74 heeft verdere karakterisering verhinderd. Pogingen om het extracellulaire deel in bacteriën te produceren resulteerde in lage opbrengsten van oplosbaar eiwit. We losten dit probleem op door CD74 te fuseren met MBP en Fh8 peptiden. We introduceerden een factor Xa knipsequentie op het MBP-CD74 fusie eiwit en een 3C knipsequentie op het Fh8-CD74 fusie eiwit. Na expressie werd het MBP en de Fh8 peptide verwijderd van het fusie-eiwit door te knippen met factor Xa en 3C proteasen. Na het knippen zuiverden we het CD74 knipproduct. Dit gaf echter niet helemaal het gewenste resultaat omdat het gewenste CD74 knipproduct vergezeld werd door andere CD74 degradatie producten en verdere zuivering erg problematisch bleek.

MIF-bindingsstudies lieten zien dat alle CD74 fusie-eiwitten en knipproducten, behalve sssCD74 die de aminozuren 77-125 mist, functioneel waren. Vanwege de zuiveringsproblemen van de functionele CD74 knipproducten werden de MBP-sCD74 en de Fh8-ssCD74 fusie-eiwitten gebruikt in verdere bindingsstudies voor het bepalen van de EC_{50} en/of de K_D . De dosis-afhankelijke ELISA liet een EC_{50} -waarde van ongeveer 110 nM voor MBP-sCD74 en 280 nM

voor Fh8-ssCD74 zien. De ITC bindingsstudie liet een K_D -waarde van ongeveer 1.3 μM zien voor MBP-sCD74. We hebben niet de K_D -waarde van Fh8-ssCD74 gemeten omdat de reactie enthalpie in het ITC experiment laag was. Hierdoor was het lastig om solide bindingsdata via ITC te verkrijgen. Gelchromatographie experimenten lieten zien dat al de gezuiverde CD74 eiwitten zich voornamelijk in hun trimere vorm bevonden, hetgeen de natuurlijke vorm is van CD74 eiwitten.

Verder lieten de ELISA-bindingsexperimenten met verschillende CD74 constructen zien dat het verwijderen van de aminozuren 77-112 van CD74 (in het Fh8-ssCD74 construct) de binding met MIF beïnvloed, maar niet volledig verwoest. Dit suggereert dat de aminozuren 113-125 van CD74 betrokken zijn bij de interactie met MIF. Verder leidde de deletie van de aminozuren 77-125 (in het sssCD74 construct) tot een totaal gebrek aan binding met MIF. Dit impliceert dat het extracellulaire trimerisatie domein van CD74 niet of slechts beperkt betrokken is in het binden van MIF, waardoor het niet genoeg respons geeft in de bindingsstudies.

In **hoofdstuk 4** onderzoeken we een divers-gesubstitueerde collectie van stoffen met een chroomen-groep die gesynthetiseerd is door middel van veelzijdige cyano-acetamide chemie. De SOS voor de remming op MIF tautomerase activiteit resulteerde in een aantal hits met een IC_{50} in de lage micromolair range. Preincubatie en verdunningsexperimenten lieten zien dat de remmers reversibel aan MIF binden. Enzym kinetiek analyse van de meest potente remmer liet zien dat deze remmer niet direct competitief met het substraat 4-HPP bindt.

Hoofdstuk 5 beschrijft de synthese van structuur-gebaseerde-ontwerp stoffen van stoffen met een isoxazool, benzoxazool of triazool-fenolgroep door gebruik te maken van bekende synthese routes. Verschillende substituenten werden op specifieke plekken in de stoffen aangebracht. De stoffen werden vervolgens getest voor hun effect op de remming van MIF tautomerase activiteit en de structuur-functie relatie werd geanalyseerd. Dit resulteerde in een aantal MIF remmers met een triazool-fenolgroep met IC_{50} 's in de micromolair range. Verder suggereren we dat triazool-fenol een veelbelovende klasse van stoffen is voor systematische rondes van ontwerp en synthese om de structuur-activiteit relatie van MIF binding op te helderen en, uiteindelijk, voor het ontwikkelen van krachtige remmers van de MIF-CD74 binding.

Toekomstperspectieven

MIF is een cytokine die een sleutelrol speelt in de progressie van ontstekingsziekten en kanker. Kleine remmers zijn ontwikkeld en toegepast om de rol van MIF in immuun gerelateerde ziekten te onderzoeken. Naast ISO-1, een remmer die veelvuldig wordt gebruikt als referentiestof, lieten ook andere kleine remmers die ontdekt waren in MIF tautomerase activiteitstesten een positief effect zien op tal van ziektemodellen. De isoxazolen en de 1,2,3-triazolen zijn twee belangrijke klassen van stoffen waarvan krachtige MIF remmers zijn ontwikkeld. Samenvattend laat dit de potentie van MIF remmers zien op de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor ontstekingsziekten en kanker.

Als het gaat om de ontwikkeling van MIF remmers, moet opgemerkt worden dat sigmoïdale enzym kinetiek, covalent- of slow-tight bindingsgedrag ertoe kan leiden dat het remmingspotentieel wordt overschat in een MIF tautomerase activiteitstest. Deze problemen maken de analyse van MIF binding complex. Vanwege deze problemen stellen we voor om naast de enzym kinetiek experimenten ook preincubatie en verdunningsexperimenten uit te voeren. Het vinden van krachtige MIF remmers met de gewenste eigenschappen zal de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor ontstekingsziekten en kanker mogelijk te maken.

Er zou ook aandacht gegeven moeten worden aan de MIF homoloog D-DT, waarvan gesuggereerd is dat het een overlappend functioneel spectrum heeft met MIF. Dit impliceert dat een medicijn dat zowel gericht is op MIF als op D-DT synergistische effecten teweeg kan brengen. Verdere details moeten echter nog worden opgehelderd.

Post-translationele modificaties van MIF, zoals modificaties gerelateerd aan redox gedrag, zouden de binding van kleine remmers kunnen verstoren. Dit is een interessante en nieuwe onderzoekslijn.

De bindingstesten van MIF aan CD74 laten zien dat de CD74 regio bestaande uit, op zijn minst, de aminozuren 113-125 essentieel lijken te zijn voor de interactie met MIF (zoals beschreven in **hoofdstuk 3**). Dit levert bruikbare inzichten op voor toekomstige onderzoeken aangaande de constructie van functionele en stabiele extracellulaire CD74 eiwitten en voor verder onderzoek van de MIF-CD74 bindingskaart.

De gevonden chromeen MIF remmers (in **hoofdstuk 4**) moeten verder onderzocht worden met betrekking tot de interferentie van de MIF-CD74 interactie in PPI bindingsstudies. Verder moeten de functionele consequenties van de verstoring van de MIF cytokine activiteit in kaart worden gebracht in cel-studies en in relevante ziektemodellen.

De gevonden triazool-fenol MIF remmers (**hoofdstuk 5**) moet verder worden onderzocht voor hun reversibiliteit en hun kinetische eigenschappen, om verder inzicht te krijgen in hun type van inhibitie. Wanneer wordt bepaald dat de inhibitie reversibel en competitief is, kunnen we de MIF enzymatische active site gebruiken om de kleine remmers in te verankeren, terwijl we andere substituenten op de triazoolring plaatsen die uit de active site steken. We verwachten dat een dergelijk construct de interactie tussen MIF en CD74 verstoord, aangezien bekend is dat de interactie tussen MIF en CD74 dicht bij de active site plaats vindt. Structuur-gebaseerd ontwerp zou het daarom mogelijk moeten maken om nieuwe remmers te vinden die de MIF-CD74 interactie kunnen verstoren en mogelijk kunnen leiden tot nieuwe medicijnen met betere eigenschappen. Vervolgonderzoek van **hoofdstuk 5** richt zich op deze mogelijkheid.