

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2020.6.2.139>

Synthesis and evaluation of inhibitors for Polo-box domain of Polo-like kinase 1

Eun Kyoung Ryu^{1,*}

¹Research Center for Bioconvergence Analysis, Korea Basic Science Institute, 162, Yeongudanji-ro, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungbuk, 28119, Korea

ABSTRACT

Polo-like kinase 1 (Plk1) is a key protein in mitosis and has been validated as a target for tumor therapy. It is well known to highly overexpress in many kinds of tumor, which has been implicated as a potential biomarker for tumor treatment and diagnosis. Plk1 consists of two domains, the N-terminus kinase domain and the C-terminus polo-box domain (PBD). The inhibitors have been developed for PBD of Plk1, which were shown a high level of affinity and selectivity for Plk1 that led to mitotic arrest and apoptotic cell death. This review discusses the inhibitors for PBD of Plk1 that are suitable for in vivo tumor treatment. They can be further extended for developing in vivo imaging probes for early diagnosis of tumor.

Key Word: Polo-like kinase 1, Polo-box domain, inhibitor, Tumor, Treatment, Diagnosis

Introduction

생체 내에서 일어나는 단백질-단백질 간의 상호작용 (protein-protein interaction)은 생명현상의 본질을 이해하는 핵심적인 반응이며, 세포 안에서 존재하는 수 많은 단백질과 단백질 간의 신호 전달, 대사 등 다양한 상호 유기적인 작용의 기본적인 중요한 정보를 제공한다. 따라서 단백질-단백질 간의 상호작용을 규명하고 단백질의 핵심 결합 부위를 이해하는 것은 생체 내 생물학적 기능을 밝힐 수 있을 뿐 아니라, 이는 최근 부작용을 최소화하는 새로운 신약을 개발하는 연구로 이어지고 있는 추세이다. 표적 단백질과 저해제가 서로 결합을 이룰 때 형성되는 구조로부터 많은 유용한 정보를 이해하고 분석을 통해, 질환 특정 단백질에 대한 선택적이고 특이적인 저해제의 개발 연구로 널리 진행되고 있다(1, 2).

Polo-like kinase (Plk)은 세포의 증식 및 세포의 유사분

열 시 전 과정에서 중요한 역할을 한다(3-5). Plk는 세린/트레오닌 kinase 단백질로, Plk family에는 지금까지 5 종류 (Plk1, Plk2, Plk3, Plk4, and Plk5)가 발견되었다(6-9). 그 중 Plk1의 기능이 가장 많이 알려져 있는데, 특히, 암세포에서 Plk1 단백질이 과발현 되어 있고, 종양의 발생 조절기전과도 연관되어 있다는 연구 결과가 보고되면서, 다양한 종양에서 표적 바이오마커로 연구하고 있다(10, 11). 즉, Plk1은 정상세포에서와는 달리 빠르게 증식하는 종양세포에서 과발현 되어 있고, 종양의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다(10, 12). 하지만 여전히 종양 발생 기전에 대한 Plk1의 기능이 정확하게 규명되어 있지는 않지만, 최근 Plk1 단백질은 연구자들에게 종양 표적 단백질로 매력적인 바이오마커이며, 이 단백질에 대한 관심이 고조되고 있다. 또한 다양한 종양에서 효과적인 종양 치료를 위해 Plk1 단백질을 선택적으로 억제하는 항암제 개발 연구가 활발한 추세이다(13, 14). Plk1 단백

Received: December 15, 2020 / Revised: December 24, 2020 / Accepted: December 29, 2020

Corresponding Author : Eun Kyoung Ryu, Korea Basic Science Institute, 162, Yeongudanji-ro, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungbuk, 28119, Korea, Tel: 043-240-5091, Email: ekryu@kbsi.re.kr

Copyright©2020 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

질은 N-말단의 ATP 결합 부위인 kinase 도메인과, C-말단의 polo-box domain (PBD)으로 이루어져 있으며, Plk1 저해제 개발은 두 개의 단백질을 각각 타겟으로 하여 연구를 진행하고 있다(15, 16). Plk1 단백질의 N-말단 ATP 표적 저해제들은 대부분 저분자 화합물을 바탕으로 발전하였다(17, 18). 그 중 현재 임상에 적용하기에 가장 앞선 기술로는 BI-2536의 저분자 화합물, Boehringer Ingelheim에서 개발한 dihydropteridinone의 구조로 이루어진 저해제이다(그림 1)(19, 20). BI-2536은 Plk1 단백질 N-말단의 kinase 도메인을 타겟으로 Plk1 단백질과 결합하여 Plk1의 활성을 억제하는 기전으로, Plk1에 높은 결합력(Plk1: $IC_{50} = 0.83$ nM, Plk2: $IC_{50} = 3.5$ nM, and Plk3: $IC_{50} = 9.0$ nM)을 보였다(21). 하지만 BI-2536은 ATP 결합 부위인 kinase 타겟에 대한 저해제이기 때문에, 생체 내 다른 비특이적인 kinase와 상호작용으로 나타냄으로써, 선택성이 낮고, 그로 인한 심각한 부작용을 초래하게 되는 등 임상에 적용하는 데 한계점을 보였다(22). 따라서 BI-2536보다 최적화된 다른 저해제 개발이 필요한 실정이다. 그래서, 위와 같은 단점을 극복하고, Plk1 단백질에 대한 선택성과 특이성이 향상된 저해제 개발을 위해서, Plk1 단백질에만 존재하는 C-말단의 PBD 단백질을 타겟으로 하는 저해제를 개발하게 되었다(17, 23, 24). 본 종설에서는 Plk1 단백질 C-말단의 PBD를 타겟으로 단백질-단백질 상호작용을 이해하여 구조 기반의 저해제를 디자인하고, 종양 억제 효과를 보고한 최근 연구 결과들을 토대로 하여 Plk1 타겟 저해제를 소개하고자 한다.

1. Plk1 단백질 펩타이드 기반 유도체, Pro-Leu-His-Ser-phospho-Thr (PLHSpT)

Plk1 단백질의 kinase 도메인을 타겟으로 하는 저해제는 생체 내 비특이적인 kinase 도메인과의 결합으로 선택성이 낮고, 다른 부작용을 초래하는 결과를 얻게 되었다. 그래서 미국 국립보건원(National Institutes of Health, NIH)의 Yun et. al. 연구실에서는 단백질-저해제 구조 기반을 통해 Plk1 단백질에 대한 펩타이드 저해제를 먼저 디자인하고, 합성한 저해제 유도체들과 표적 단백질간의 결합 및 활성을 바탕으로 최종적으로 Plk1 PBD 단백질과의 결합 및 활성이 최적화된 저해제를 합성하여, 그 결과를 발표하였다(25). 먼저 단백질과 저해제간의 상호작용을 살펴보고자, Plk1 PBD 단백질

과 합성한 인산화된 펩타이드(phosphopeptide)의 크리스탈 구조를 통해서 둘 사이의 결합을 위해서 반드시 필요한 필수 아미노산 잔기를 살펴보고, 표적 단백질과의 결합을 위해 유도체에 포함되어야 하는 기능기(functional group)를 포함하여 최적화된 펩타이드 저해제 유도체들을 디자인하였다(그림 2). 단백질과 저해제 유도체의 구조로부터 인산화된 serine과 threonine 아미노산 서열(Ser-phospho-Thr, SpT)이 Plk1 PBD 단백질과 결합하는데 가장 핵심 아미노산 서열인 것을 알 수 있었다. 그래서 SpT 아미노산 잔기를 포함하고, 2개부터 14개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 유도체들을 합성하여 Plk1 PBD와의 결합 실험(PBD binding inhibition assay)을 진행하였다. 그 결과 5개의 아미노산 서열로 이루어진 Pro-Leu-His-Ser-phospho-Thr (PLHSpT) 펩타이드가 PBD와 가장 높은 결합력 ($K_d = 0.445$ μ M)을 가지는 결과를 도출함으로써 Plk1 PBD에 대한 최적의 펩타이드 유도체를 합성하였다(그림 1). 또한 Plk 단백질 family인 plk1, plk2, plk3에 대한 특이성을 확인한 결과 PLHSpT 펩타이드 유도체가 Plk1에만 선택적으로 결합을 하였다. 이는 또한 Plk1 PBD 단백질과 PLHSpT 펩타이드 유도체의 complex 크리스탈 구조를 통해서 그 결과를 설명할 수 있었다(그림 2). PLHSpT 펩타이드 유도체의 N-말단에 존재하는 Pro-Leu-His의 아미노산 서열 부분이 Plk1 PBD와 높은 결합과 특이성을 보이고 있었고, Ser-Thr 아미노산 서열 부분은 Plk PBD와 수소결합을 통해 저해제와 표적 단백질 간 결합의 안정화를 유지시켜 주는 역할을 하고 있었다(그림 2). 이렇게 단백질-저해제 상호작용 및 결합을 구조를 통해 확인하고 분석하여 Plk1 PBD 단백질에 대한 PLHSpT 펩타이드 유도체를 개발하였다. 그리고 개발한 유도체를 Hela 종양 세포에 처리하여, 세포 증식 억제 실험을 진행하고자 하였다. 하지만 본 연구에서 개발된 펩타이드 기반 유도체는 가장 큰 장점인 정상세포에 대한 독성이 없고, 표적 단백질간의 결합력 및 특이성이 우수한 장점에도 불구하고, 펩타이드 기반 저해제가 가지는 근본적인 단점인 세포막을 투과할 수 없는 한계점을 가지고 있었다. 그래서 종양 세포에서 억제 효과를 관찰하기 위해서 microinjection 방법을 통해, 즉 직접적으로 종양 세포막 안쪽으로 주사하여 Hela 세포에서 변화를 관찰하였다. 그 결과 PLHSpT 펩타이드 저해제가 종양 세포의 세포 분열 과정 중에 세포 분열을 억제하여 종양 세포의 증식을 막는다는 것을 확인하였다. 또한 PLHSpT 펩타이드의 Plk1 PBD 단

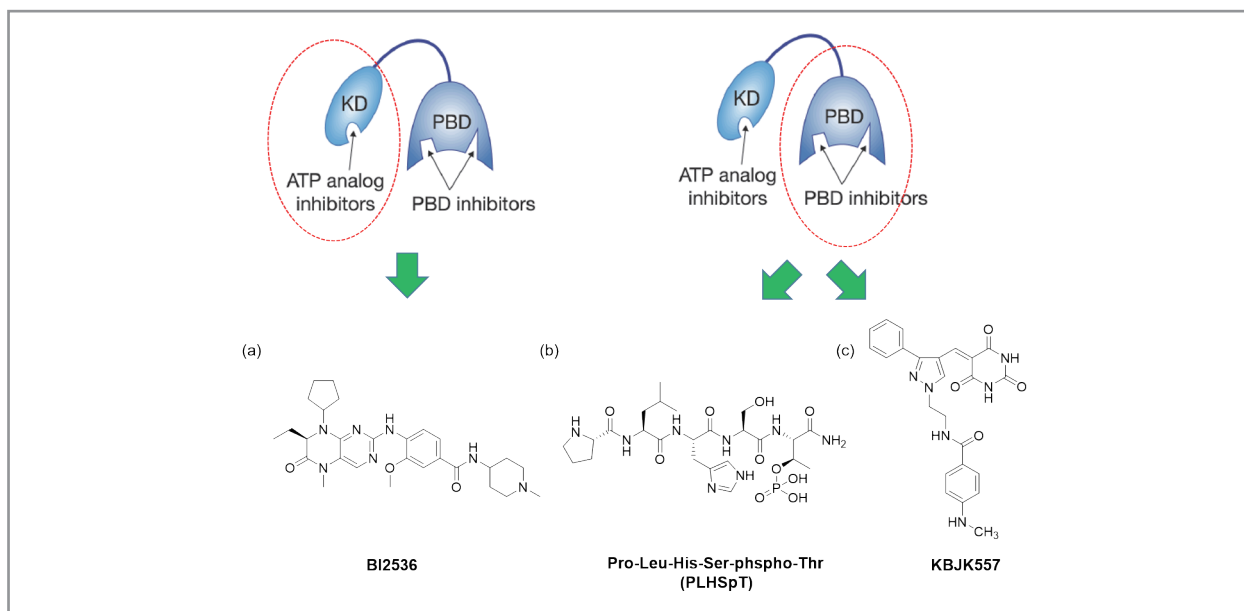


Figure 1. Inhibitor structure of BI2536 (a), Pro-Leu-His-Ser-phospho-Thr (b), and KBJK557 (c) in Kinase domain (KD) and Polo-box domain (PBD) of Polo-like kinase 1(15)

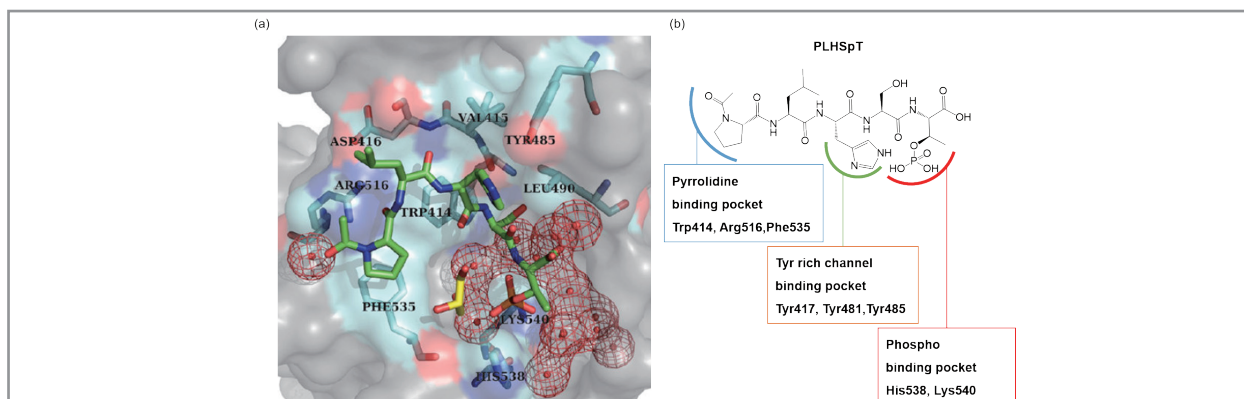


Figure 2. Crystal structure (a) and binding site (b) of Plk1 PBD in complex with PLHSpT(25)

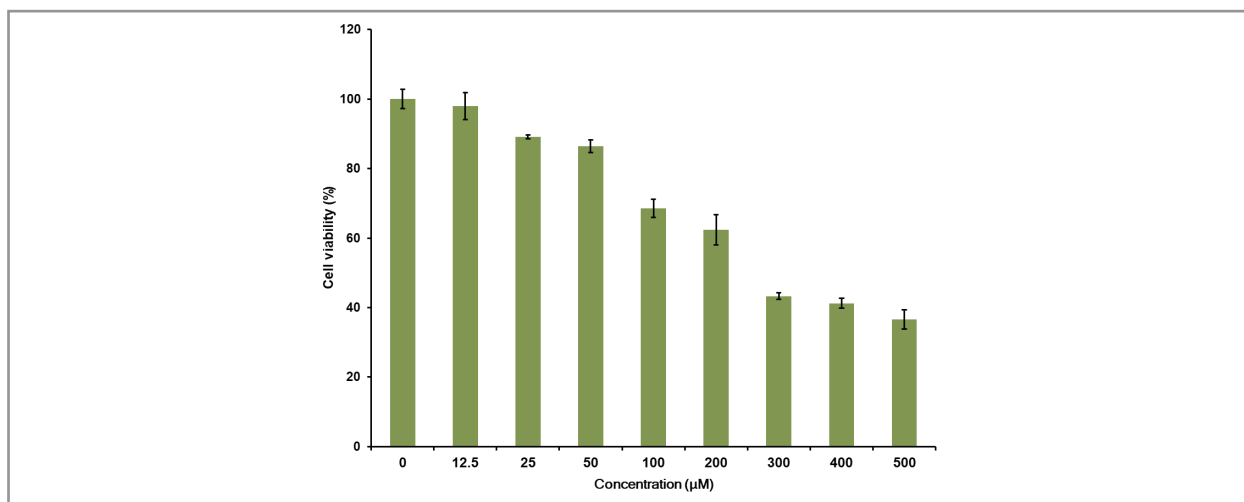


Figure 3. Cell viability of KBJK557 was determined by MTT assay. Cells were treated with various concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, and 500 μM) of KBJK557 for 24 h(29).

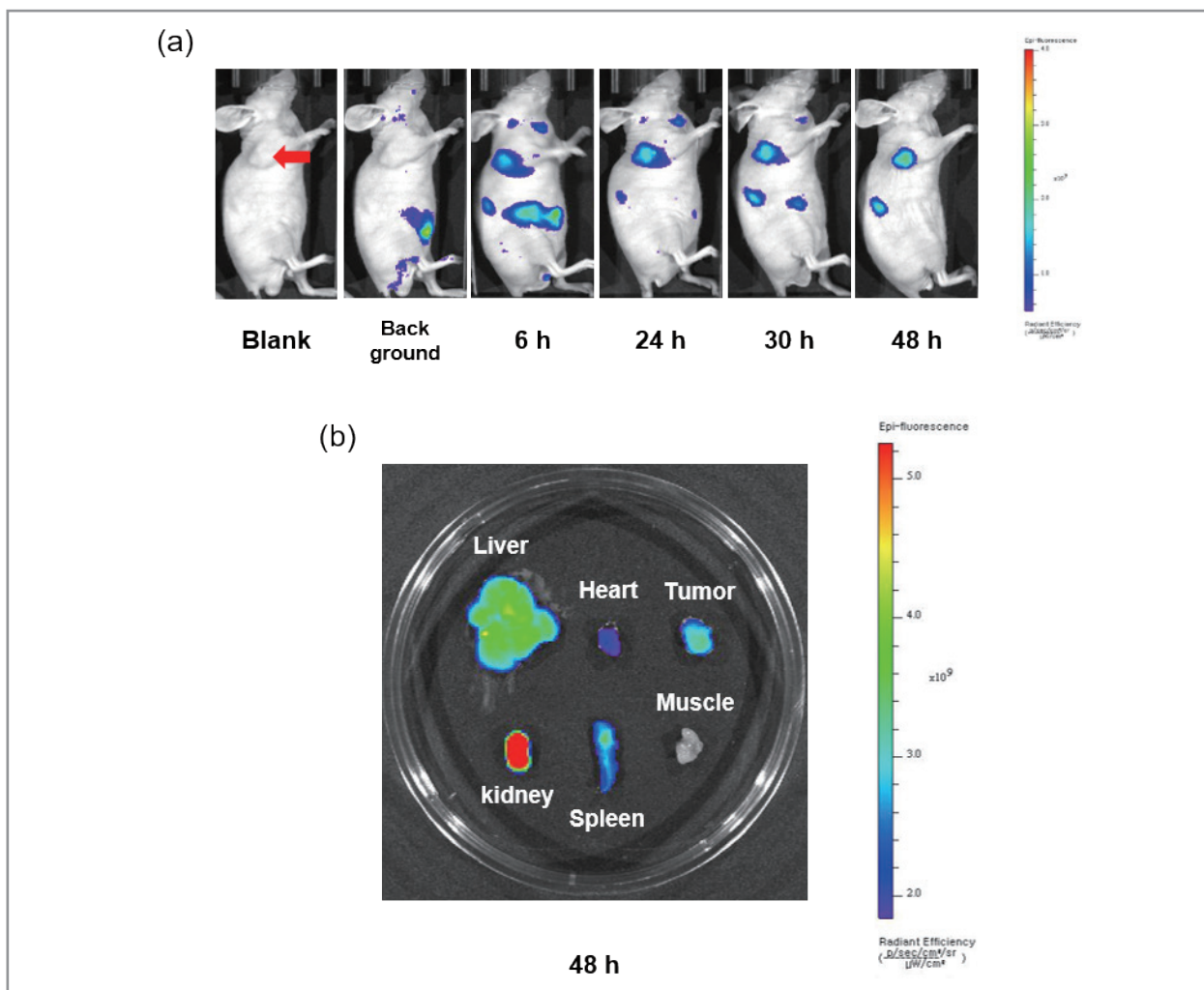


Figure 4. Fluorescence images of cyanine 5-conjugated KBJK557 in HeLa tumor-bearing mice. (a) Sagittal of fluorescence images were obtained at 6, 24, 30, and 48 h after injection of cyanine 5-conjugated KBJK557 (5 mg/kg body weight/200 μ L). Red arrows indicated tumors of mice. (b) Ex vivo fluorescence images of major organs and tumor. After in vivo fluorescence images, mice were sacrificed and ex vivo fluorescence images were obtained (48 h) (29).

백질에 대한 기전 규명을 위한 실험들을 통해 개발한 저해제가 Plk PBD를 선택적으로 표적 하는 것을 관찰하였다. 따라서 본 연구에 참여한 연구자들은 PLHSpT 펩타이드가 항암제로 발전할 수 있을 것으로 기대하였다. 또한 본 연구 결과로부터 개발된 펩타이드 저해제는 향후 Plk PBD 표적 저해제 개발에 대한 연구의 기초가 되었다. 임상에 적용하기 위해서는 여전히 극복해야 할 많은 문제점을 가지고 있는데, 특히 본 연구에서 개발한 펩타이드 유도체의 단점인 세포막 투과를 향상시키고 항암제로 치료제로 개발하기 위해, pro-drug 및 drug delivery system 등 다양한 방법을 활용하여 한계점을 극복한 여러가지 유도체를 연구하고 있다 (26–28).

2. Plk1 단백질 저분자 화합물 기반 유도체, KBJK557

한국기초과학지원연구원 Gunasekaran et. al. 연구실에서는 앞서 언급한 펩타이드 유도체의 세포막 투과가 어려운 단점을 극복하고, Plk PBD 단백질에 선택적이고 특이적으로 결합할 수 있는 저분자 화합물 기반의 저해제를 개발하였다(그림1)(29). 저해제와 표적 단백질간의 구조-활성 상관관계(Structure activity relationship, SAR)을 바탕으로 Plk1 PBD에 적합한 새로운 저해제를 고안하였다. 선행 연구 결과로부터 단백질-저해제 크리스탈 구조에서 Plk1 PBD단백질과 결합하는 핵심적인 부위에 pyrrolidine 결합과, tyrosine-rich channel, 그리고 phosphate 결합 부위

가 존재하는 것을 확인하였고, 이 결합 부위가 표적 단백질과 저해제간의 선택성과 특이성을 향상시키는데 가장 핵심적으로 관여한다는 것을 알게 되었다(30). 그래서 저분자 화합물 중에 pyrazole을 포함하는 여러 가지 유도체를 합성하고, 표적 단백질과의 활성(SAR)을 확인하였다. 그 결과 N-알킬기와 페닐기를 가진 pyrazole 유도체와 free NH기를 가진 barbituric acid가 Plk1 PBD 활성에 연관이 있다는 것을 알았다. 또한 유도체의 구조에서 p-아미노 메틸페닐기에 연결된 amide 형태가 표적 단백질과의 결합을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다. 그래서 이러한 단백질-저해제간의 상호작용을 구조로부터 확인한 결과를 바탕으로, Plk1 PBD 단백질에 최적화된 저해제 후보로 pyrazolopyrimidine을 포함하는 저분자 화합물 유도체로 KBJK557을 합성하여 생물학적 평가 및 그 기전을 관찰하였다(29).

KBJK557의 Plk1에 대한 특이성을 확인하고자 Plk family인 Plk1, Plk2, Plk3 각각의 단백질에 대해서 결합력을 실험해 보았다. 그 결과 IC₅₀ 값이 Plk1에서는 3.05 μM, Plk2에 대해서는 7.52 μM로, KBJK557이 Plk1 단백질에 대해서 Plk2 보다 2 배 정도 높은 결합력을 가지고 있었다. 그리고 종양 세포인 Hela cell의 증식 억제 실험을 통해서 저해제의 종양 치료 효과를 확인해 보았다. KBJK557은 위의 펩타이드 기반 저해제인 PLHSpT 와는 달리 세포막을 쉽게 투과하였으며, KBJK557를 농도에 따라 종양 세포에 처리한 결과, 농도에 비례하여 종양 세포를 억제하는 경향을 확인하였다(IC₅₀ = 235 μM) (그림 3). 또한 치료 효과를 확인하기 위해 개발한 저해제를 종양 실험 동물에 주사하고, 3 주 동안 관찰하였는데, 대조군에 비해 종양의 크기가 확연히 감소하는 결과로부터 KBJK557의 종양 치료효과를 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구자들은 연구 결과로부터 개발한 저해제는 앞으로 Plk1 PBD를 표적으로 하는 치료제로 개발이 가능할 것으로 평가하였다. 그리고 본 연구에서 개발한 저해제를 바탕으로 생체 영상을 획득할 수 있는 종양 표적 진단제로 활용이 가능한지를 평가해 보고자 하였다. KBJK557에 형광 dye인 cyanine 5를 결합하여 종양이 이식되어 있는 실험 동물 모델에 형광 표지 KBJK557 (cyanine 5-conjugated KBJK557)을 주사하여 생체 형광 영상을 관찰하였다(그림 4). 그 결과 주사 후 6시간부터 높은 종양 섭취를 보였으며 종양 조직과 근육의 비율을 시간 별로 관찰했을 때, 주사 후 30시간이 지났을 때 가장 종양의 섭취 비율이 높았다(2.1, 3.9, and 4.11

at 6, 24 and 30 h)(그림 4). 따라서 본 연구에서 개발한 KBJK557 저분자 화합물은 종양을 치료하는 치료제뿐만 아니라, 종양을 진단할 수 있는 진단제로써의 가능성을 확인하였다. 또한 이 결과는 Plk1 PBD 단백질을 타겟으로 저분자 화합물을 활용하여 처음으로 생체 내에서 영상으로 획득하고자 시도한 연구 결과로 그 의미가 높다고 강조하였다.

Conclusion

Plk1 단백질은 세포 분열 과정에서 중요한 조절 인자이며, 특히 종양 세포에서 과 발현되어 있는 Plk1의 기능 및 역할을 이해하고 연구하는 것이 최근 종양 치료제 개발에 대한 중요한 타겟으로 부각되고 있다. 현재까지도 아직 정확하게 종양 세포에서의 Plk1 단백질의 발생 기전이 명확히 규명되지는 않지만, 실제로 많은 연구자들이 Plk1 단백질을 종양 표적 바이오마커로 이용하고 있다. 이 종설에서는 단백질-단백질, 단백질-저해제 간의 상호작용을 구조를 바탕으로 개발한 저해제들을 살펴보았다. 이들은 모두 Plk1 단백질에 높은 선택성과 특이성을 가지는 것으로 확인되었다. 질환 특정 단백질에 대한 선택성과 특이성은 항암제 개발에 가장 중요한 요소이며, 또한 바이오영상 분야와 종양을 조기에 진단할 수 있는 영상 프로브 개발에도 적극적으로 고려되어야 하는 인자이다. 따라서 본 종설에서 소개한 저해제들을 활용하여 향후 종양을 진단할 수 있는 영상 진단제로써의 응용 및 활용도 기대해 본다.

Acknowledgments

이 논문은 한국연구재단 중견연구자지원사업(2020R1A2C1009289)의 지원에 의하여 이루어졌으며 다른 이해관계는 없음을 밝힙니다.

References

- Pagliaro L, Felding J, Audouze K, Nielsen SJ, Terry RB, Krog-Jensen C, and Butcher S, Emerging classes of protein-protein interaction inhibitors and new tools for their development. *Curr Opin Chem Biol* 2004;8(4):442-9.
- Koes DR and Camacho CJ, PocketQuery: protein-protein interaction inhibitor starting points from protein-protein interaction structure. *Nucleic Acids Res* 2012;40(Web Server issue):W387-92.
- Park JE, Soung NK, Johmura Y, Kang YH, Liao C, Lee KH, Park CH, Nicklaus MC, and Lee KS, Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(12):1957-70.
- van Vugt MA and Medema RH, Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene* 2005;24(17):2844-59.
- Zitouni S, Nabais C, Jana SC, Guerrero A, and Bettencourt-Dias M, Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(7):433-52.
- Archambault V and Glover DM, Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(4):265-75.
- Petronczki M, Lenart P, and Peters JM, Polo on the Rise—from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* 2008;14(5):646-59.
- Degenhardt Y and Lampkin T, Targeting Polo-like kinase in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010;16(2):384-9.
- Winkles JA and Alberts GF, Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene* 2005;24(2):260-6.
- Spankuch-Schmitt B, Wolf G, Solbach C, Loibl S, Knecht R, Stegmuller M, von Minckwitz G, Kaufmann M, and Strebhardt K, Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene* 2002;21(20):3162-71.
- Scharow A, Raab M, Saxena K, Sreeramulu S, Kudlinzki D, Gande S, Dotsch C, Kurunci-Csacsco E, Klaeger S, Kuster B, Schwalbe H, Strebhardt K, and Berg T, Optimized Plk1 PBD Inhibitors Based on Poloxin Induce Mitotic Arrest and Apoptosis in Tumor Cells. *ACS Chem Biol* 2015;10(11):2570-9.
- Stegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lenart P, Petronczki M, Krssak M, Gurtler U, Garin-Chesa P, Lieb S, Quant J, Grauert M, Adolf GR, Kraut N, Peters JM, and Rettig WJ, BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol* 2007;17(4):316-22.
- Murugan RN, Park JE, Kim EH, Shin SY, Cheong C, Lee KS, and Bang JK, Plk1-targeted small molecule inhibitors: molecular basis for their potency and specificity. *Mol Cells* 2011;32(3):209-20.
- Strebhardt K and Ullrich A, Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6(4):321-30.
- Lee KS, Burke TR, Jr., Park JE, Bang JK, and Lee E, Recent Advances and New Strategies in Targeting Plk1 for Anticancer Therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36(12):858-877.
- Normandin K, Lavallee JF, Futter M, Beaudrait A, Duchaine J, Guiral S, Marinier A, and Archambault V, Identification of Polo-like kinase 1 interaction inhibitors using a novel cell-based assay. *Sci Rep* 2016;5:37581.
- Lee KS, Park JE, Kang YH, Kim TS, and Bang JK, Mechanisms underlying Plk1 polo-box domain-mediated biological processes and their physiological significance. *Mol Cells* 2014;37(4):286-94.
- Baby B, Antony P, Al Halabi W, Al Homedi Z, and Vijayan R, Structural insights into the polypharmacological activity of quercetin on serine/threonine kinases. *Drug Des Devel Ther* 2016;10:3109-3123.

19. Lian G, Li L, Shi Y, Jing C, Liu J, Guo X, Zhang Q, Dai T, Ye F, Wang Y, and Chen M, BI2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, in combination with cisplatin exerts synergistic effects on gastric cancer cells. *Int J Oncol* 2018;52(3):804-814.
20. Mross K, Frost A, Steinbild S, Hedbom S, Rentschler J, Kaiser R, Rouyre N, Trommeshauser D, Hoelzl CE, and Munzert G, Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of BI 2536, a novel Polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008;26(34):5511-7.
21. Fode C, Motro B, Yousefi S, Heffernan M, and Dennis JW, Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the Drosophila polo kinase and involved in cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(14):6388-92.
22. Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lelias JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, and Lockhart DJ, A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 2005;23(3):329-36.
23. Ahn M, Han YH, Park JE, Kim S, Lee WC, Lee SJ, Gunasekaran P, Cheong C, Shin SY, Sr., Kim HY, Ryu EK, Murugan RN, Kim NH, and Bang JK, A new class of peptidomimetics targeting the polo-box domain of Polo-like kinase 1. *J Med Chem* 2015;58(1):294-304.
24. Park JE, Hymel D, Burke TR, Jr., and Lee KS, Current progress and future perspectives in the development of anti-polo-like kinase 1 therapeutic agents. *F1000Res* 2017;6:1024.
25. Yun SM, Moulaei T, Lim D, Bang JK, Park JE, Shenoy SR, Liu F, Kang YH, Liao C, Soung NK, Lee S, Yoon DY, Lim Y, Lee DH, Otaka A, Appella E, McMahon JB, Nicklaus MC, Burke TR, Jr., Yaffe MB, Wlodawer A, and Lee KS, Structural and functional analyses of minimal phosphopeptides targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(8):876-82.
26. Kim SM, Yoon S, Choi N, Hong KS, Murugan RN, Cho G, and Ryu EK, In vivo tumor imaging using polo-box domain of polo-like kinase 1 targeted peptide. *Biomaterials* 2012;33(29):6915-25.
27. Kim SM, Chae MK, Lee C, Yim MS, Bang JK, and Ryu EK, Enhanced cellular uptake of a TAT-conjugated peptide inhibitor targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1. *Amino Acids* 2014;46(11):2595-603.
28. Yim MS, Soung NK, Han EH, Min JY, Han H, Son EJ, Kim HN, Kim B, Bang JK, and Ryu EK, Vitamin E-Conjugated Phosphopeptide Inhibitor of the Polo-Box Domain of Polo-Like Kinase 1. *Mol Pharm* 2019;16(12):4867-4877.
29. Gunasekaran P, Yim MS, Ahn M, Soung NK, Park JE, Kim J, Bang G, Shin SC, Choi J, Kim M, Kim HN, Lee YH, Chung YH, Lee K, EunKyeong Kim E, Jeon YH, Kim MJ, Lee KR, Kim BY, Lee KS, Ryu EK, and Bang JK, Development of a Polo-like Kinase-1 Polo-Box Domain Inhibitor as a Tumor Growth Suppressor in Mice Models. *J Med Chem* 2020;63(23):14905-14920.
30. Park JE, Kim TS, Meng L, Bang JK, Kim BY, and Lee KS, Putting a bit into the polo-box domain of polo-like kinase 1. *J Anal Sci Technol* 2015;6(1):27.