

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 11 月 28 日 (28.11.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/239392 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/099965
- (22) 国际申请日: 2023 年 6 月 13 日 (13.06.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310604347.6 2023年5月24日 (24.05.2023) CN
- (71) 申请人: 南方科技大学 (SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽学苑大道 1088 号, Guangdong 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 蒋兴宇 (JIANG, Xingyu); 中国广东省深圳市南山区西丽学苑大道 1088 号, Guangdong 518055 (CN)。 李轩宇 (LI, Xuanyu); 中国广东

省深圳市南山区西丽学苑大道 1088 号, Guangdong 518055 (CN)。 李家安 (LI, Jiaan); 中国广东省深圳市南山区西丽学苑大道 1088 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 广州嘉权专利商标事务所有限公司 (JIAQUAN IP LAW); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西 100 号富力盈泰广场 A 栋 910, Guangdong 510627 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) **Title:** CHIMERIC UBIQUITIN LIGASE CAPABLE OF TARGETED DEGRADATION OF KRAS, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向降解KRAS的嵌合泛素连接酶及其制备方法和应用

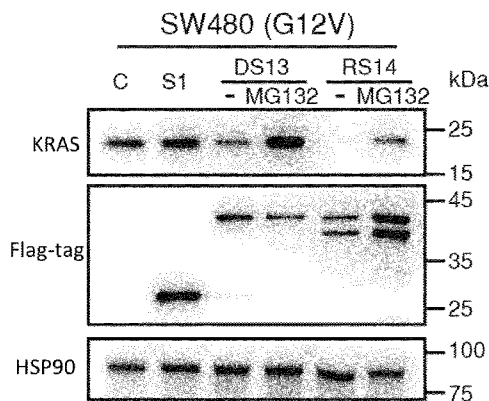


图 2

(57) **Abstract:** Disclosed are a chimeric ubiquitin ligase capable of targeted degradation of KRAS, a preparation method therefor and the use thereof. The chimeric ubiquitin ligase comprises a KRAS binding domain and E3 ubiquitin ligase binding protein, the KRAS binding domain comprising at least one of RAF1(52-188), ARAF, PIP5K1A, RASSF2, APP, KRAS and RAF1. Further disclosed are a nucleic acid molecule encoding the chimeric ubiquitin ligase, a vector comprising the nucleic acid molecule, a host cell comprising the nucleic acid molecule or the vector, the preparation method for the chimeric ubiquitin ligase, and the use of same in preparing formulations for degrading KRAS proteins or drugs for treating KRAS-related cancers. The chimeric ubiquitin ligase can degrade different KRAS mutants.

(57) 摘要: 公开了靶向降解KRAS的嵌合泛素连接酶及其制备方法和应用。该嵌合泛素连接酶包括KRAS结合结构域和E3泛素连接酶结合蛋白; KRAS结合结构域包括RAF1(52-188)、ARAF、PIP5K1A、RASSF2、APP、KRAS、RAF1中的至少一种。还公开了编码上述嵌合泛素连接酶的核酸分子; 包括上述核酸分子的载体; 包括上述核酸分子或载体的宿主细胞; 嵌合泛素连接酶的制备方法; 及该酶在制备降解KRAS蛋白的制剂或治疗KRAS相关癌症的药物中的应用。嵌合泛素连接酶能降解不同的突变型KRAS。

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于生物医药领域，具体涉及靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶及其制备方法和应用。

背景技术

RAS 是肿瘤中常见的突变基因。正常细胞中，RAS 的激活处于细胞膜生长因子受体家族下游通路中。RAS 蛋白是一种膜结合型的 GTP/GDP 结合蛋白（GTPase），当其结合 GTP 时为活化状态，结合 GDP 时为失活状态。RAS 异构体主要由三种基因编码：KRAS、NRAS 和 HRAS。KRAS 是 RAS 家族中最主要的突变型，并且与 22% 的人类肿瘤相关，是人类三大致命性癌症，肺癌（17%），结直肠癌（33%）和胰腺癌（61%）中高频突变基因。常见的 KRAS 突变主要发生在 2 号外显子中 12、13、61 和 146 等密码子上，其中发生在第 12 和 13 位点的突变占总突变数量的 90%。

目前，对蛋白质活性的抑制主要是针对目标蛋白质的活性位点进行小分子抑制剂的开发，然而研究表明不包括 KRAS 蛋白在内，85% 的蛋白质是“不可成药蛋白”，这类蛋白质因为结构松散易变、细胞内部其它小分子竞争结合能力强、活性位点容易发生突变等原因使得很难对其进行抑制剂的开发。即使目前有开发出部分针对 KRAS 的小分子抑制剂，但这些抑制剂与 KRAS 的结合面积太小，KRAS 稍有突变，构象改变，就会影响小分子抑制剂的结合。

此外，在蛋白质水平降解蛋白质在细胞中的积累也是减弱蛋白质表达的重要策略，其中蛋白质降解是减少其在细胞中积累的重要方法。主流的蛋白质靶向降解技术是通过构建嵌合分子将目标蛋白和 E3 连接酶连接在一起，进而促进目标蛋白的降解，典型代表技术为 PROTAC（蛋白降解靶向嵌合体）。据报道，目前已有多种蛋白质能够通过 PROTAC 技术被迅速降解。然而，该技术中一种 PROTAC 只能降解一种突变型 KRAS，并不能降解多种突变型 KRAS，不具有普遍适用性。

发明内容

本发明旨在至少解决上述现有技术中存在的技术问题之一。为此，本发明提出一种靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶，能够降解不同的突变型 KRAS。

本发明还提出一种核酸分子。

本发明还提出一种载体。

本发明还提出一种宿主细胞。

本发明还提出所述靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶的制备方法。

本发明还提出所述靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶在制备产品中的应用。

根据本发明的一个方面，提出了一种靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶，包括 KRAS 结合结构域和 E3 泛素连接酶结合蛋白；所述 KRAS 结合结构域包括 RAF1（52-188）、ARAF、PIP5K1A、RASSF2、APP、KRAS、RAF1 中的至少一种；

所述 RAF1（52-188）的氨基酸序列为：

SEQ ID NO:1: ASSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVRGLQ
PECCAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLDHVPLTTHNFARKTFLKL
AFCDICQKFLNGFRCQTCGYKFHEHCSTKVPTMCVDW；或

SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后，且功能相同或相似的氨基酸序列；

所述 ARAF 的氨基酸序列为：

SEQ ID NO:2: ASEPPRGPPANGAEPSRAVGTVKVYLPNKQRTVVTVRDGMSVY
DSLDKALKVRGLNQDCCVVYRLIKGRKTVTAWDTAIAPLDGEELIVEVLEDVPLTMH
NFVRKTFEFLAFCDFCLKFLFHGFRCQTCGYKFHQHCSSKVPTVCVDMSTNRQQPSR
FYHSVQDLSSGSRQHEAPSNRPLNELLPQGSPRTQHCDPEHFPPAPANAPLQIRIS
TSTPNVHMOVSTTAPMDSNLIQLTGQSFSTDAAGSRGGSDGTPRGSPSPASVSSGRKSP
HSKSPAEQRERKSLADDDKKVKNLGYRDSGYWVEVPPSEVQLLKRIGTGSFGTVFRG
RWHGDVAVKVLKVSQPTAEQAQAFKNEMQVLRKTRHVNILLFMGMTRPGFAITQ

WCEGSSLYHHLHVADTRFDMVQLIDVARQTAQGMDYLHAKNIIHRDLKSNNIFLHEG
LTVKIGDFGLATVKTRWSGAQPLEQPSGSVLWMAAEVIRMQDPNPYSFQSDVYAYGV
VLYELMTGSLPYSHIGCRDQIIFMVGRGYLSPDLSKISSNCPKAMRRLSDCLKFQREE
RPLFPQILATIELLQRS LPK IERSASEPSLHRTQADELPACLLSAARLVPG; 或

SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,
且功能相同或相似的氨基酸序列;

所述 PIP5K1A 的氨基酸序列为:

SEQ ID NO:3: ASASASSGPSSSVGFSSFDPAVP SCTLSSAASGIK RPMASEVLEAR
QDSYISLVPYASGMPIKKIGHRSVDSSGETTYKKTSSALKGAIQLGITHTVGS LSTKPE
RDVLMQDFYVVESIFFPSEGSNLTPAHHYNDFRFKTYAPVAFRYFRELFGIRPDDYLYS
LCSEPLIELCSSGASGSLFYVSSDDEFIIKTVQHKEAEFLQKLLPGYYMNLNQNPR TLL
PKFYGLYCVQAGGKNIRIVVMNNLLPRSVKMHIKYDLKGSTYKRRASQKEREKPLPT
FKDLDFLQDIPDGLFLDADMYNALCKTLQRDCLVLQSFKIMDYSLLMSIH NIDHAQR
EPLSSETQYSVDTRRPAPQKALYSTAMESIQGEARRGGT METDDHMGGIPARN SKGE
RLLLYIGIIDILQSYRFVKKLEHSWKALVHDGDTVSVHRPGFYAERFQR FMCNTVFKK
IPLKPSPSKKFRSGSSFSRRAGSSGNSCITYQPSVSGEHKAQVTTKAEVEPGVHLGRPD
VLPQTTPLEEISEGSPIDPSFSPLVGETLQMLTTSTTLEKLEVAESEFTHG; 或

SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,
且功能相同或相似的氨基酸序列;

所述 RASSF2 的氨基酸序列为:

SEQ ID NO:4: ASDYSHQTS LVPCGQDKYISKNE LLLHLKTYNLYYEGQNLQLRH
REEEDEFIVEGLLNISWGLRRPIRLQM QDDNERIRPPPSSSSWHSGCNLGAQGTT LKPL
TVPKVQISEVDAPPEGDQMPSS TDSRGLKPLQEDTPQLMRTRSDVGVRRRGNV RTPS
DQRRIRRHRSINGHFYNHKTSVFTPAYGSVTNVRINSTMTTPQVLKLLLNKF KIENSA
EEFALYVVHTSGEKQKLKATDYPLIARILQGPCEQISKVFLMEKDQVEEV TYDVAQYI
KFEMPVLKSFIQKLQEEEDREVKKLMRKYTVLRLMIRQRLEEIAETPATIG; 或

SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后，且功能相同或相似的氨基酸序列；

所述 APP 的氨基酸序列为：

SEQ ID NO:5: ASLPGLALLLLAAWTARALEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGRNLN
MHMNVQNGKWSDPSGKTCTCIDTKEGILQYCQEVYPELQITNVVEANQPVTIQNWC
KRGRKQCKTHPHFVIPYRCLVGEFVSDALLVPDKCKFLHQERMDVCETHLHWHTVA
KETCSEKSTNLHDYGMLLPCGIDKFRGVFEVCCPLAEESDNVDSADAEEDDSVWW
GGADTDYADGSEDKVVEVAEEEEVAEVEEEEEADDDDEDDGDEVEEEAEPEYEEATE
RTTSIATTTTTTTESVEEVVREVCSEQAETGPCRAMISRWFVDVTEGKCAPFFYGGCG
GNRNNFDTEEYCMVCGSAMSQSLLKTTQEPLARDPVKLPPTTAASTPDAVDKYLETP
GDENEHAHFQKAKERLEAKHRERMSQVMREWEEAERQAKNLPKADKKAVIQHFQE
KVESLEQEAANERQQLVETHMARVEAMLNDRRLALENYITALQAVPPRPRHVFNM
LKKYVRAEQKDRQHTLKHFEHVRMVDPKKAAQIRSQVMTHLRVIYERMNQSLSLLY
NPAVAEEIQDEVDELLQKEQNYSDVLNMISEPRISYGNDALMPSLTETKTTVELL
PVNGEFSLDDLQPWHSFGADSVANTENEVEPVDARPAADRGLTTRPGSGLTNIKTEE
ISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML
KKKQYTSIHGVEVDAAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQNG；或

SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后，且功能相同或相似的氨基酸序列；

所述 KRAS 的氨基酸序列为：

SEQ ID NO:6: ASTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFVDEYDPTIEDSYRKQ
VVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYRETIK
RVKDSQEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYT
LVREIRKHKEKMSKDGGKKKKKKSKTKCVIMG；或

SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后，且功能相同或相似的氨基酸序列；

所述 RAF1 的氨基酸序列为：

SEQ ID NO:7: ASEHIQGAWKTISNGFGFKDAVFDGSSCISPTIVQQFGYQRRASD
DGKLTDPSTKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVRGLQPECCAVFRL
LHEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLDHVPLTTHNFARKTFLKLAFCDICQKF
LLNGFRCQTCGYKFHEHCSTKVPTMCVDWSNIRQLLLFPNSTIGDSGVPALPSLTMRR
MRESVSRMPVSSQHRYSTPHAFTFNTSSPSSEGSLSQRQRSTSTPNVHVMVSTTLPVDS
RMIEDAIRSHSESASPSALSSSPNNLSPTGWSQPKTPVPAQRERAPVSGTQEKNKIRPR
GQRDSSYYWEIEASEVMLSTRIGSGSFGTVYKGKWHGDVAVKILKVVDPTPEQFQAF
RNEVAVLRKTRHVNILLFMGYMTKDNLAIVTQWCEGSSLYKHLHVQETKFQMFQLID
IARQTAQGMDYLHAKNIIHRDMKSNNIFLHEGLTVKIGDFGLATVKSRWSGSQQVEQ
PTGSVLWMAPEVIRMQDNNPFSFQSDVYSYGIVLYELMTGELPYSHINNDRDQIIFMVG
RGYASPDLSKLYKNCPKAMKRLVADCVKKVKEERPLFPQILSSIELLQHSLPKINRSAS
EPSLHRAAHTEDINACTLTTPRLPVFG；或

SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后，且功能相同或相似的氨基酸序列。

根据本发明的一种优选的实施方式，至少具有以下有益效果：

本发明提出的嵌合泛素连接酶中，RAF1 蛋白的全部或部分、ARAF、PIP5K1A、RASSF2、APP、KRAS 蛋白都可以作为特异性结合激活 KRAS 的天然结合蛋白。其中，RAF1 蛋白为 KRAS 的下游蛋白，只结合激活的 KRAS，而突变型 KRAS 基本上都是处于激活状态的。意味着大部分的突变型 KRAS 都能与 RAF1 结构域结合，即包括 RAF1 结构域的嵌合泛素连接酶可以有效降解 KRAS，解决了现有技术中的抑制剂（PROTAC）因 KRAS 突变而降低与 KRAS 结合能力的问题。另外，由于本发明中的 KRAS 结合结构域与多种突变型 KRAS 的结合能力强，使得包括 KRAS 结合结构域的嵌合泛素连接酶可以有效降解不同的突变型 KRAS，从而可用于治疗不同的癌症，适用范围广。

在本发明的一些实施方式中，所述 E3 泛素连接酶选自 HECT 结构域家族、RING 结构域家族、U-box 结构域家族 E3 泛素连接酶中的任一种。

在本发明的一些优选的实施方式中，所述 E3 泛素连接酶选自 RING 结构域家族 E3 泛素连接酶。具体地，所述 E3 泛素连接酶为接头蛋白/Cullin 蛋白/E2 泛素接合酶招募结构域。

具体地，所述 E3 泛素连接酶结合蛋白为部分或全部所述接头蛋白。

更具体地，所述 E3 泛素连接酶结合蛋白为部分所述接头蛋白，其氨基酸序列为：

a) SEQ ID NO:8: MGLDYKDDDDKASGSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELG
GLWENSRTDCCLCVAGQEFQAHKAILAARSPVFSAMFEHEMESKKNRVEINDVEP
EVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDLLAAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAA
EILILADLHSADQLKTQAVDFINYHASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQC
PFLGPPRKRLKQSGS；或

b) SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后，且功能相同或相似的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述嵌合泛素连接酶还包括连接蛋白，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:9: SGSGSG 或 SEQ ID NO:10: SGSG 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述嵌合泛素连接酶的氨基酸序列为：

a) SEQ ID NO:11: MGDYKDDDDKASSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLH
DCLMKALKVRGLQPECCAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLDHVP
LTTHNFARKTFLKLAFCDICQKFLNGFRCQTCGYKFHEHCSTKVPTMCVDWSGSGS
GSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRTDCCLCVAGQEFQAHKAILAAR
SPVFSAMFEHEMESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDLLAAA
DKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHASDVLE
TSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQSGS；或

b) SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后，且功能相同或相似的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述 ARAF 与所述 E3 泛素连接酶结合蛋白构成的嵌

合泛素连接酶的氨基酸序列为：

SEQ ID NO:12: MGDYKDDDDKASEPPRGPPANGAEPsRAVGTVKVYLPNKQRT
VVTVRDGMSVYDSLKALKVRGLNQDCCVVYRLIKGRKTVTAWDTAIAPLDGEELI
VEVLEDVPLTMHNFVRKTFFSLAFCD FCLKFLFHGFRCQTCGYKFHQHCSSKVPTVC
VDMSTNRQQPSRFYHSVQDLSSGSRQHEAPSNRPLNELLPQGSPRTQHCDPEHFPP
PAPANAPLQRIRSTSTPNVH MVSTTAPMDSNLIQLTGQSFSTDAAGSRGGS DGT PRGSP
SPASVSSGRKSPHSKSPA EQRERKSLADDDKKVKNLGYRDSGYYWEVPPSEVQLLKR
IGTGSGFTVFRGRWHGDVAVKVLKVSQPTAEQAQAFKNEMQVLRKTRHVNILLFMG
FMTRPGFAIITQWCEGSSLYHHLHVADTRFDMVQLIDVARQTAQGMDYLHAKNIIHR
DLKSNIFLHEGLTVKIGDFGLATVKTRWSGAQPLEQPSGSVLWMAAEVIRMQDPNP
YSFQSDVYAYGVVLYELMTGSLPYSHIGCRDQIIFMVGRGYLSPDL SKISSNCPKAMR
RLSDCLKFQREERPLFPQILATIELLQRSLPKIERSASEPSLHRTQADELPACLLSAARL
VPGSGSGSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENS RFTDCCLCVAGQEFQAHK
AILAARSPVFSAMFEHEMESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADD
LLAAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHA
SDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQSGS；或

SEQ ID NO:12 所示的氨基酸经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加后，且功能相同或相似的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述 PIP5K1A 与所述 E3 泛素连接酶结合蛋白构成的嵌合泛素连接酶的氨基酸序列为：

SEQ ID NO:13: MGDYKDDDDKASASASSGPSSSVGFSSFDPAVP SCTLSSAASGI
KRPMASEVLEARQDSYISLVPYASGMPIKKIGHRSVDSSGETTYKKTTSSALKGAIQL
GITHTVGSLSTKPERDVLMQDFYVVESIFFPSEGSNLTPAHHYNDFRFKTYAPVAFRYF
RELFGIRPDDYLYSLCSEPLIELCSSGASGSLFYVSSDDEFIIKTVQHKEAEFLQKLLPG
YYMNLNQNPRTLTPKFYGLYCVQAGGKNIRIVVMNNLLPRSVKMHICYDLKGSTYK
RRASQKEREKPLPTFKDLDFLQDIPDGLFLDADMYNALCKTLQRDCLVLQSFKIMDY

SLLMSIHNIDHAQREPLSSETQYSVDTRRPAPQKALYSTAMESIQGEARRGGTMETDD
HMGGIPARNKGERLLLYIGIIDILQSYRFVKKLEHSWKALVHDGDTVSVHRPGFYAE
RFQRFMCNTVFKKIPLKPSPSKKFRSGSSFSRRAGSSGNSCITYQPSVSGEHKAQVTTK
AEVEPGVHLGRPDVLPQTTPLEEISEGSPIDPSFSPLVGETLQMLTTSTTLEKLEVAESE
FTHGSGSGSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRTDCCLCVAGQEFQAH
KAILAARSPVFSAMFEHEMEESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMAD
DLLAAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYH
ASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQSGS; 或

SEQ ID NO:13 所示的氨基酸经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加后, 且功能相同或相似的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中, 所述 RASSF2 与所述 E3 泛素连接酶结合蛋白构成的嵌合泛素连接酶的氨基酸序列为:

SEQ ID NO:14: MGDYKDDDDKASDYSHQTSLVPCGQDKYISKNELLLHLKTYN
LYYEGQNLQLRHREEEDEFIVEGLLNISWGLRRPIRLQMDDNERIRPPSSSSWHSGC
NLGAQGTTLKPLTPVKVQISEVDAPPEGDQMPSSSTD SRGLKPLQEDTPQLMRTRSDV
GVRRRGNV RTPSDQRRIRRHRSINGHFYNHKTSVFTPAYGSVTNVRINSTMTTPQVL
KLLLNKFKIENSAEEFALYVVHTSGEKQKLKATDYPLIARILQGPCEQISKVFLMEKDQ
VEEV TYDVAQYIKFEMPVLKSFIQKLQEEEDREVKKLMRKYTVLRLMIRQRLEEIAET
PATIGSGSGSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRTDCCLCVAGQEFQAH
KAILAARSPVFSAMFEHEMEESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMAD
DLLAAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYH
ASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQSGS; 或

SEQ ID NO:14 所示的氨基酸经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加后, 且功能相同或相似的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中, 所述 APP 与所述 E3 泛素连接酶结合蛋白构成的嵌合泛素连接酶的氨基酸序列为:

SEQ ID NO:15: MGDYKDDDDKASLPGLALLLLAAWTARALEVPTDGNAGLLA
EPQIAMFCGRLNMHNMNVQNGKWSDPSGKTCTCIDTKEGILQYCQEVYPELQITNVVE
ANQPVTIQNWCKRGRKQCKTHPHFVIPYRCLVGEFVSDALLVPDKCKFLHQERMDV
CETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHDYGMLLPCGIDKFRGVFVCCPLAEESDNVDSAD
AEEDDSVWWGGADTDYADGSEDKVVEVAEEEEVAEVEEEEADDDDEDDEDGDEVE
EEAEEPYYEEATERTTTSIATTTTTTTESVEEVVREVCSEQAETGPCRAMISRWFVDVTEG
KCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMVCGSAMSQSLLKTTQEPLARDPVKLPTTAAST
PDAVDKYLETPGDENEHAHFQKAKERLEAKHRERMSQVMREWEEAERQAKNLPKA
DKKAVIQHFQEKVESLEQEAANERQQLVETHMARVEAMLNDRRRRLALenyITALQA
VPPRPRHVFNMLKKYVRAEQKDRQHTLKHFEHVRMVDPKKAAQIRSQVMTHLRVIY
ERMNQSLSLLYNVPAAVEEIQDEVDELLQKEQNYSDDVLANMISEPRISYGNDALMPS
LTETKTTVELLPVNGEFSLDDLQPWHSFGADSVANTENEVEPVDARPAADRGLTTRP
GSGLTNIKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVI
ATVIVITLVMLKKKQYTSIHGVEVDAAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQ
NGSGSGSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRTDCCLCVAGQEFQAHKA
ILAARSPVFSAMFEHEMEESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDL
LAAADKYALERLKMVEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHAS
DVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPLGPPRKRLKQSGS; 或

SEQ ID NO:15 所示的氨基酸经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加后, 且功能相同或相似的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中, 所述 KRAS 与所述 E3 泛素连接酶结合蛋白构成的嵌合泛素连接酶的氨基酸序列为:

SEQ ID NO:16: MGDYKDDDDKASTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDE
YDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKS
FEDIHHYREQIKRVKDSQVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAK
TRQGVDDAFYTLVREIRKHKEKMSKDGGKKKKKKSKTKCVIMSGSGSVNISGQNTM

NMVKVPECRLADELGGLWENSRTDCCLCVAGQEFQAHKAILAARSPVFSAMFEHE
MEESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDLLAAADKYALERLKV
MCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHASDVLETSGWKSMVVS
HPhLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQSGS; 或

SEQ ID NO:16 所示的氨基酸经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加后, 且功能相同或相似的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中, 所述 RAF1 与所述 E3 泛素连接酶结合蛋白构成的嵌合泛素连接酶的氨基酸序列为:

SEQ ID NO:17: MGDYKDDDDKASEHIQGAWKTISNGFGFKDAVFDGSSCISPTI
VQQFGYQRRASDDGKLTDPSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKV
RGLQPECCAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLDHVPLTTHNFARKT
FLKLAFCDICQKFLNGFRCQTCGYKFHEHCSTKVPTMCVDWSNIRQLLLFPNSTIGD
SGVPALPSLTMRRMRESVSRMPVSSQHRYSTPHAFTFNTSSPSSEGSLSQRQRSTSTPN
VHMOVSTTLPVDSRMIEDAIRSHSESASPSALSSSPNNLSPTGWSQPKTPVPAQRERAPV
SGTQEKKNIRPRGQRDSSYYWEIEASEVMLSTRIGSGSFGTVYKKGKWHGDVAVKILK
VVDPTPEQFQAFRNEVAVLRKTRHVNILLFMGYMTKDNLAIVTQWCEGSSLYKHLHV
QETKFQMFQLIDIARQTAQGMDYLHAKNIIHRDMKSNIFLHEGLTVKIGDFGLATVK
SRWSGSQQVEQPTGSVLWMAPEVIRMQDNNPFSFQSDVYSYGIVLYELMTGELPYSH
INNIRDQIIFMVGRGYASPDLSKLYKNCPKAMKRLVADCVKKVKEERPLFPQILSSIELL
QHSLPKINRSASEPSLHRAAHTEDINACTLTTSPLRPVFGSGSGSVNISGQNTMNMVK
VPECRLADELGGLWENSRTDCCLCVAGQEFQAHKAILAARSPVFSAMFEHEMEESK
KNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDLLAAADKYALERLKVMCEDA
LCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHASDVLETSGWKSMVVSHPHLVA
EAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQSGS; 或

SEQ ID NO:17 所示的氨基酸经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加后, 且功能相同或相似的氨基酸序列。

根据本发明的第二个方面，提出了一种核酸分子，包括编码所述靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶的 DNA 或 mRNA。

根据本发明的第三个方面，提出了一种载体，包括所述核酸分子。

在本发明的一些实施方式中，所述载体为表达载体。

具体地，包括所述核酸分子的载体可用于克隆或用于生产表达载体，所述载体可以是质粒、病毒、噬菌体或任何其他遗传工程中通常使用的载体。

具体地，所述载体除包括所述核酸分子外，还可包括用于控制表达的真核或原核元件，如用于启动和终止转录和/或翻译的调节序列、增强子、启动子、信号序列等。

在本发明的一些实施方式中，所述载体包括细菌、真菌、昆虫、病毒或哺乳动物载体。

根据本发明的第四个方面，提出了一种宿主细胞，包括所述核酸分子或所述载体，所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

具体地，所述核酸分子或所述载体可被引入合适的宿主细胞。所述核酸分子可被引入所述宿主细胞的基因组；所述载体可在胞质中以染色体外的形式存在或被并入所述宿主细胞的染色体中。

在本发明的一些实施方式中，所述原核细胞为细菌细胞。

在本发明的一些实施方式中，所述真核细胞包括酵母细胞、丝状真菌细胞、哺乳动物细胞或昆虫细胞。

根据本发明的第五个方面，提出了所述靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶的制备方法，包括以下步骤：培养第四方面的宿主细胞，得所述嵌合泛素连接酶。

根据本发明的第六个方面，提出了所述靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶在制备产品中的应用，所述产品为如下任一种：

- a) 降解 KRAS 蛋白的制剂；
- b) 治疗 KRAS 相关癌症的药物。

在本发明的一些实施方式中，所述 KRAS 蛋白包括野生型 KRAS 蛋白和突变型

KRAS 蛋白中的至少一种。

在本发明的一些实施方式中，所述突变型 KRAS 蛋白包括在 G12、G13、S17、P34、A59、Q61、A146 的至少一个氨基酸位置处发生突变的 KRAS 蛋白。

在本发明的一些实施方式中，所述 KRAS 相关癌症包括但不限于结直肠癌、肺癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌中的至少一种。

附图说明

下面结合附图和实施例对本发明做进一步的说明，其中：

图 1 为本发明实施例 2 的 Western blotting 检测结果图；其中，C-空白对照组，未进行转染；S1-对照组，转入 SPOP (167-374)；DS13 (-)-转入 DS13 表达载体，未加 MG132 (蛋白酶体抑制剂)；DS13 (MG132)-转入 DS13 表达载体，加入 MG132；RS14 (-)-转入 RS14 表达载体，未加 MG132；RS14 (MG132)-转入 RS14 表达载体，加入 MG132；Flag-tag 指示 S1、DS13 和 RS14 的蛋白表达；HSP90-内参蛋白；

图 2 为本发明实施例 3 的 Western blotting 检测结果图；其中，C-空白对照组，未进行转染；S1-对照组，转入 SPOP (167-374)；DS13 (-)-转入 DS13 表达载体，未加 MG132；DS13 (MG132)-转入 DS13 表达载体，加入 MG132；RS14 (-)-转入 RS14 表达载体，未加 MG132；RS14 (MG132)-转入 RS14 表达载体，加入 MG132；Flag-tag 指示 S1、DS13 和 RS14 的蛋白表达；HSP90-内参蛋白；

图 3 为本发明实施例 4 的 Western blotting 检测结果图；其中，C-空白对照组，未进行转染；S1-对照组，转入 SPOP (167-374)；DS13 (-)-转入 DS13 表达载体，未加 MG132；DS13 (MG132)-转入 DS13 表达载体，加入 MG132；RS14 (-)-转入 RS14 表达载体，未加 MG132；RS14 (MG132)-转入 RS14 表达载体，加入 MG132；Flag-tag 指示 S1、DS13 和 RS14 的蛋白表达；HSP90-内参蛋白；

图 4 为本发明实施例 5 的 Western blotting 检测结果图；其中，C-空白对照组，未进行转染；S1-对照组，转入 SPOP (167-374)；DS13 (-)-转入 DS13 表达载体，未加 MG132；DS13 (MG132)-转入 DS13 表达载体，加入 MG132；RS14 (-)-转入 RS14 表达载体，未加 MG132；RS14 (MG132)-转入 RS14 表达载体，加入 MG132；Flag-tag 指示 S1、

DS13 和 RS14 的蛋白表达：HSP90-内参蛋白。

具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

本发明的描述中，除非另有明确的限定，转染、培养等词语应做广义理解，所属技术领域技术人员可以结合技术方案的具体内容合理确定上述词语在本发明中的具体含义。

本发明的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”等的描述意指结合该实施例描述的具体特征、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例。而且，描述的具体特征、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例中以合适的方式结合。

实施例中所使用的试验方法如无特殊说明，均为常规方法；所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到的试剂和材料。

实施例 1

本实施例制备了一种靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶 RS14，具体过程为：

(1) 从 PDB 数据库中查找可以结合 KRAS 的蛋白 RAF1，并截取与 KRAS 结合的蛋白片段 RAF1 (52-188) (氨基酸序列如 SEQ ID NO:1: ASSKTSNTIRVFLPNKQRTV VNVRNGMSLHDCLMKALKVRGLQPECCAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGE ELQVDFLDHVPLTTHNFARKTFLKLAFCDICQKFLNGFRCQTCGYKFHEHCSTKVPT MCVDW 所示)；将 RAF1 (52-188) 与接头蛋白 SPOP (167-374) (简称 S1，该接头蛋白作为 E3 泛素连接酶结合蛋白，用于与 E3 泛素连接酶 (接头蛋白/Cullin 蛋白/E2 泛素接合酶招募结构域) 中的 Cullin 蛋白结合；其氨基酸序列如 SEQ ID NO:8: MGLDYK DDDDKASGSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRTDCCLCVAGQEFQA HKAILAARSPVFSAMFEHEMESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMA DDLLAAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINY HASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCFLGPPRKRLKQSGS 所示) 连接，

中间用连接蛋白（氨基酸序列如 SEQ ID NO:9: SGSGSG 所示）连接，形成嵌合泛素连接酶 RS14（其氨基酸序列如 SEQ ID NO:11: MGDYKDDDDKASSKTSNTIRVFLPN KQRTVVNVNRNGMSLHDCLMKALKVRGLQPECCAVFRLLEHKGKKARLDWNTDA ASLIGEELQVDFLDHVPLTTHNFARKTFLKLAFCDICQKFLNNGFRCQTCGYKFHEHC STKVPTMCVDWSGSGSGSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRTDCCLC VAGQEFQAHKAILAARSPVFSAMFEHEMEESSKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYT GK APNLDKMADDLLAAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLK TQAVDFINYHASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQSG S 所示）。

根据嵌合泛素连接酶 RS14 的氨基酸序列推导出对应的 mRNA 序列，如 SEQ ID NO:18: 5'-ATGGGCGACTACAAAGATGACGACGATAAAGCCTCCAGCAAGACCAGCA ACACCATCAGAGTGTTCTCCTGCCTAACAAGCAGAGGACTGTGGTGAACGTGAGAAA CGGCATGTCTCTGCATGACTGCCTGATGAAGGCCCTGAAGGTGAGAGGCCTGCAG CCCGAGTGCTGTGCCGTGTTTCAGACTGCTGCACGAGCACAAGGGCAAGAAGGCC AGACTGGACTGGAACACCGATGCCGCCAGCCTGATCGGCGAGGAGCTGCAGGTG GATTTCTGACCATGTGCCTCTGACAACTCACAACCTTTGCCCGGAAAACCTTTCT GAAGCTCGCATTCTGCGACATCTGCCAGAAGTTTCTGCTGAACGGGTTCAGGTGTC AGACCTGCGGCTATAAATTCCACGAGCACTGCTCTACCAAGGTGCCAACCATGTGT GTGGACTGGAGCGGCAGCGGATCTGGCAGCGTGAACATTAGTGGCCAGAACACCA TGAATATGGTTAAAGTCCCAGAGTGCAGACTGGCCGACGAGCTGGGCGGCCTGTG GGAGAACTCTCGCTTCACCGACTGTTGCCTGTGCGTGGCCGGCCAGGAGTTCCAG GCCACAAGGCCATTCTGGCCGCACGCAGCCCCGTGTTCTCCGCCATGTTTGAGCA CGAGATGGAGGAGAGCAAGAAAAACCGGGTGGAAATCAACGATGTGGAACCTGA GGTGTTCAAGGAGATGATGTGCTTCATCTACACAGGCAAGGCCCAAACCTCGAC AAAATGGCCGACGACCTGCTGGCCGCCGCCGACAAATATGCTCTGGAAAGGCTGA AGGTGATGTGCGAGGATGCTCTGTGCAGTAATCTGAGCGTGGAGAACGCAGCCGA

GATCCTGATTCTGGCCGACCTGCACAGCGCCGACCAGCTGAAGACCCAGGCCGTG
GACTTTATCAACTATCATGCTTCAGACGTGCTGGAAACTAGTGGCTGGAAGAGCAT
GGTGGTTAGCCACCCACACCTGGTGGCTGAGGCCTATAGGTCCCTGGCCTCTGCTC
AGTGCCCATTTCTGGGCCCTCCCCGGAAGAGACTGAAGCAGTCTGGAAGCTGA-3'

所示。将该 mRNA 序列插入质粒中，形成 RS14 表达载体。使用该 RS14 表达载体进行以下试验。

实施例 2

本实施例测试了 RS14 能否敲降 HT29 细胞（结肠癌细胞）中的野生型 KRAS，具体过程为：

在测试时，还使用构建的另外一种嵌合泛素连接酶 DS13 来进行验证，其中，DS13 是将可以结合 KRAS 的蛋白 DARPin.K27 和 SPOP（167-374）连接，得到嵌合泛素连接酶 DS13（其氨基酸序列如 SEQ ID NO:19: MGASGSDLGKKLLEAARAGQDDEVRI LMANGADVNAHDTFGFTPLHLAALYGHLEIVEVLLKNGADVNADDSYGRTPHLAA MRGHLEIVEVLLKYGADVNAADEEGRTPLHLAAKRGHLEIVEVLLKNGADVNAQDK FGKTAFDISIDNGNEDLAEILQKLNGSGSGSGSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGG LWENSRFTDCCLCVAGQEFQAHKAILAARSPVFSAMFEHEMEESKKNRVEINDVEPE VFKEMMCFIYTGKAPNLDMADDLLAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEI LILADLHSADQLKTQAVDFINYHASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCP FLGPPRKRLKQSGSDYKDDDDKS 所示）。其对应的 mRNA 序列如 SEQ ID NO:20: 5' -ATGGGCGCCTCCGGAAGCGACCTCGGCAAGAAGCTGCTGGAGGCCGCCAGAGCC GGCCAGGACGATGAAGTGAGAATCCTGATGGCCAATGGAGCCGACGTGAACGCCC ACGACACCTTCGGATTCACACCTCTGCACCTGGCCGCTCTGTACGGCCACCTGGA GATCGTGGAGGTGCTGCTGAAAAACGGCGCTGACGTGAATGCCGATGACAGCTAC GGCAGAACACCCCTGCACCTCGCCGCCATGAGAGGGCACCTGGAGATTGTGGAGG TGCTGCTGAAGTACGGGGCCGACGTGAACGCCGCCGATGAAGAGGGAAGGACTC CACTGCACCTGGCCGCAAAGCGCGGGCACCTGGAAATCGTGGAGGTGCTGCTGA

AGAATGGGGCAGACGTGAACGCTCAGGACAAGTTCGGCAAAACAGCCTTCGACA
TCTCCATCGACAACGGCAACGAAGACCTGGCCGAAATCCTGCAGAAGCTGAATGG
CAGCGGCAGCGGATCTGGCAGCGTGAACATTAGTGGCCAGAACACCATGAATATG
GTTAAAGTCCCAGAGTGCAGACTGGCCGACGAGCTGGGCGGCCTGTGGGAGAAC
TCTCGCTTCACCGACTGTTGCCTGTGCGTGGCCGGCCAGGAGTTCAGGCCACACA
AGGCCATTCTGGCCGCACGCAGCCCCGTGTTCTCCGCCATGTTTGAGCACGAGATG
GAGGAGAGCAAGAAAAACCGGGTGGAATCAACGATGTGGAACCTGAGGTGTTT
AAGGAGATGATGTGCTTCATCTACACAGGCAAGGCCCCAAACCTCGACAAAATGG
CCGACGACCTGCTGGCCGCCGCCGACAAATATGCTCTGGAAAGGCTGAAGGTGAT
GTGCGAGGATGCTCTGTGCAGTAATCTGAGCGTGGAGAACGCAGCCGAGATCCTG
ATTCTGGCCGACCTGCACAGCGCCGACCAGCTGAAGACCCAGGCCGTGGACTTTA
TCAACTATCATGCTTCAGACGTGCTGGAAACTAGTGGCTGGAAGAGCATGGTGGTT
AGCCACCCACACCTGGTGGCTGAGGCCTATAGGTCCCTGGCCTCTGCTCAGTGCCC
ATTTCTGGGCCCTCCCCGGAAGAGACTGAAGCAGTCTGGAAGCGACTACAAGGAC
GACGATGATAAGAGTTGA-3'所示。将该 mRNA 序列插入质粒中，形成 DS13 表达载体，进行如下试验。

在六孔板上种 1×10^6 个 HT29 细胞，加入细胞培养液（添加 10% 胎牛血清 FBS 和 $1 \times$ 青霉素/链霉素的 McCoy's 5A），置于 5% CO_2 ，37°C 的培养箱中培养。过夜后将 McCoy's 5A 培养液替换成 1mL 的 OPTI 培养液，将 2 μg 的 S1、DS13 表达载体和 RS14 表达载体分别用商用转染试剂 Lipofectamine MessengerMAX 转染到 HT29 细胞中。转染 6h 后，提取细胞总蛋白用于进行 Western blotting 分析。分析结果如图 1 所示，C 为空白对照组，未进行转染；S1 为对照组，转入 SPOP (167-374)；DS13 (-) 为转入 DS13 表达载体，未加 MG132（蛋白酶体抑制剂）；DS13 (MG132) 为转入 DS13 表达载体，加入 MG132；RS14 (-) 为转入 RS14 表达载体，未加 MG132；RS14 (MG132) 为转入 RS14 表达载体，加入 MG132；Flag-tag 指示 S1、DS13 和 RS14 的蛋白表达（因为 S1、DS13 和 RS14 均有 Flag-tag 标签）；HSP90 作为内参蛋白。可以看出，与对照组相比，DS13 能显著降

低 KRAS 的条带灰度，而 RS14 的降低效果不明显。表明 DS13 能敲降野生型 KRAS，而 RS14 对野生型 KRAS 的敲降作用不明显。

实施例 3

本实施例测试了 RS14 能否敲降 SW480 细胞（人结肠癌细胞）中的 G12V 突变型 KRAS，具体过程为：

在六孔板上种 1×10^6 个 SW480 细胞，加入细胞培养液（添加 10% FBS 和 $1 \times$ 青霉素/链霉素的 Leibovitz's L-15），置于 5% CO_2 ，37°C 的培养箱中培养。过夜后将 Leibovitz's L-15 培养液替换成 1mL 的 OPTI 培养液，将 2 μg 的 S1、DS13 表达载体和 RS14 表达载体分别用商用转染试剂 Lipofectamine MessengerMAX 转染到 SW480 细胞中。转染 6h 后，提取细胞总蛋白用于进行 Western blotting 分析。分析结果如图 2 所示，具体标记同实施例 2。可以看出，与对照组相比，RS14 能显著降低 KRAS 的条带灰度，而 DS13 的降低效果不明显。表明 RS14 能敲降 G12V 突变型 KRAS，而 DS13 对 G12V 突变型 KRAS 的敲降作用不明显。

实施例 4

本实施例测试了 RS14 能否敲降 A549 细胞（人非小细胞肺癌细胞）中的 G12S 突变型 KRAS，具体过程为：

在六孔板上种 1×10^6 个 A549 细胞，加入细胞培养液（添加 10% FBS 和 $1 \times$ 青霉素/链霉素的 Ham's F-12K），置于 5% CO_2 ，37°C 的培养箱中培养。过夜后将 Ham's F-12K 培养液替换成 1mL 的 OPTI 培养液，将 2 μg 的 S1、DS13 表达载体和 RS14 表达载体分别用商用转染试剂 Lipofectamine MessengerMAX 转染到 A549 细胞中。转染 6h 后，提取细胞总蛋白用于进行 Western blotting 分析。分析结果如图 3 所示，具体标记同实施例 2。可以看出，与对照组相比，RS14 能显著降低 KRAS 的条带灰度，而 DS13 的降低效果不明显。表明 RS14 能敲降 G12S 突变型 KRAS，而 DS13 对 G12S 突变型 KRAS 的敲降作用不明显。

实施例 5

本实施例测试了 RS14 能否敲降 PANC1 细胞（人胰腺癌细胞）中的 G12D 突变型

KRAS，具体过程为：

在六孔板上种 1×10^6 个 PANC1 细胞，加入细胞培养液（添加 10% FBS 和 $1 \times$ 青霉素/链霉素的 DMEM），置于 5% CO_2 ，37°C 的培养箱中培养。过夜后将 DMEM 培养液替换成 1mL 的 OPTI 培养液，将 2 μg 的 S1、DS13 表达载体和 RS14 表达载体分别用商用转染试剂 Lipofectamine MessengerMAX 转染到 PANC1 细胞中。转染 6h 后，提取细胞总蛋白用于进行 Western blotting 分析。分析结果如图 4 所示，具体标记同实施例 2。可以看出，与对照组相比，RS14 降低 KRAS 条带灰度的效果较 DS13 的效果更明显。表明 RS14 能敲降 G12D 突变型 KRAS。

从以上实施例可以看出，RS14 可以降解多种突变型 KRAS，而不降解野生型 KRAS，这可能是由于 RAF1 蛋白更易与激活的 KRAS（即突变型 KRAS）结合。

上面对本发明实施例作了详细说明，但是本发明不限于上述实施例，在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内，还可以在不脱离本发明宗旨的前提下作出各种变化。此外，在不冲突的情况下，本发明的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

权 利 要 求 书

1.一种靶向降解 KRAS 的嵌合泛素连接酶,其特征在于,包括 KRAS 结合结构域和 E3 泛素连接酶结合蛋白;所述 KRAS 结合结构域包括 RAF1(52-188)、ARAF、PIP5K1A、RASSF2、APP、KRAS、RAF1 中的至少一种;

所述 RAF1 (52-188) 的氨基酸序列为: SEQ ID NO:1; 或 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,且功能相同或相似的氨基酸序列;

所述 ARAF 的氨基酸序列为: SEQ ID NO:2; 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,且功能相同或相似的氨基酸序列;

所述 PIP5K1A 的氨基酸序列为: SEQ ID NO:3; 或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,且功能相同或相似的氨基酸序列;

所述 RASSF2 的氨基酸序列为: SEQ ID NO:4; 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,且功能相同或相似的氨基酸序列;

所述 APP 的氨基酸序列为: SEQ ID NO:5; 或 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,且功能相同或相似的氨基酸序列;

所述 KRAS 的氨基酸序列为: SEQ ID NO:6; 或 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,且功能相同或相似的氨基酸序列;

所述 RAF1 的氨基酸序列为: SEQ ID NO:7; 或 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,且功能相同或相似的氨基酸序列。

2.根据权利要求 1 所述的嵌合泛素连接酶,其特征在于,所述 E3 泛素连接酶结合蛋白的氨基酸序列为:

SEQ ID NO:8; 或 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后,且功能相同或相似的氨基酸序列。

3.根据权利要求 2 所述的嵌合泛素连接酶,其特征在于,所述嵌合泛素连接酶的氨基酸序列为:

a) SEQ ID NO:11: MGDYKDDDDKASSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVNRNGMSLH

DCLMKALKVRGLQPECCAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLDHVP
LTTHNFARKTFLKLAFCDICQKFLNGFRCQTCGYKFHEHCSTKVPTMCVDWSGSGS
GSVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRTDCCLCVAGQEFQAHKAILAAR
SPVFSAMFEHEMEESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDLLAAA
DKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHASDVLE
TSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQSGS; 或

b) SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列经一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加修饰后, 且功能相同或相似的氨基酸序列。

4.一种核酸分子, 其特征在于, 所述核酸分子包括编码权利要求 1~3 任一项所述嵌合泛素连接酶的 DNA 或 mRNA。

5.一种载体, 其特征在于, 所述载体包括权利要求 4 所述的核酸分子。

6.根据权利要求 5 所述的载体, 其特征在于, 所述载体包括细菌、真菌、昆虫、病毒或哺乳动物载体。

7.一种宿主细胞, 其特征在于, 所述宿主细胞包括权利要求 4 所述核酸分子或权利要求 5~6 任一项所述载体, 所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

8.权利要求 1~3 任一项所述嵌合泛素连接酶的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤: 培养权利要求 7 所述的宿主细胞, 得所述嵌合泛素连接酶。

9.权利要求 1~3 任一项所述嵌合泛素连接酶在制备产品中的应用, 其特征在于, 所述产品为如下任一种:

a) 降解 KRAS 蛋白的制剂;

b) 治疗 KRAS 相关癌症的药物。

10.根据权利要求 9 所述的应用, 其特征在于, 所述 KRAS 蛋白包括野生型 KRAS 蛋白和突变型 KRAS 蛋白中的至少一种;

优选地, 所述突变型 KRAS 蛋白包括在 G12、G13、S17、P34、A59、Q61、A146 的至少一个氨基酸位置处发生突变的 KRAS 蛋白。

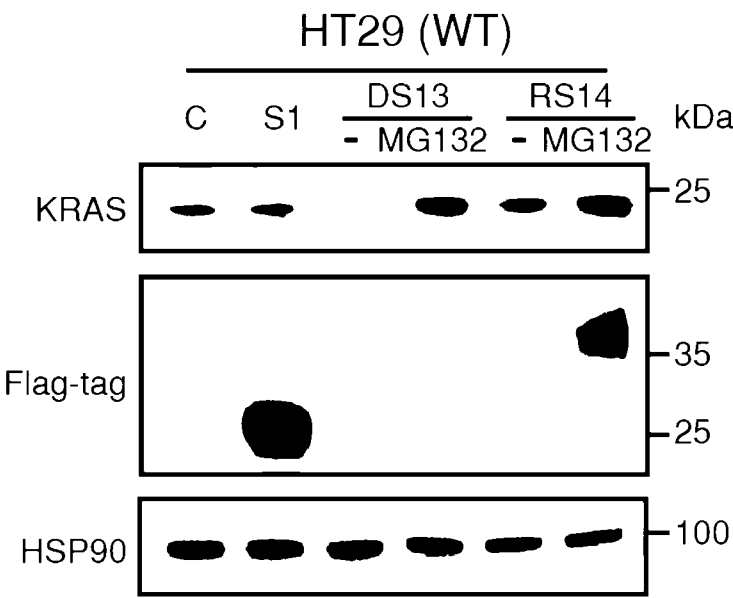


图 1

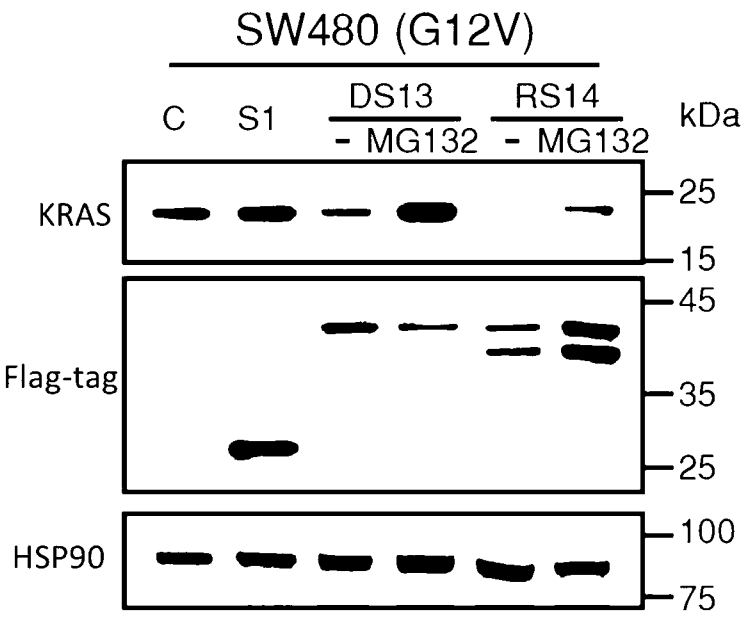


图 2

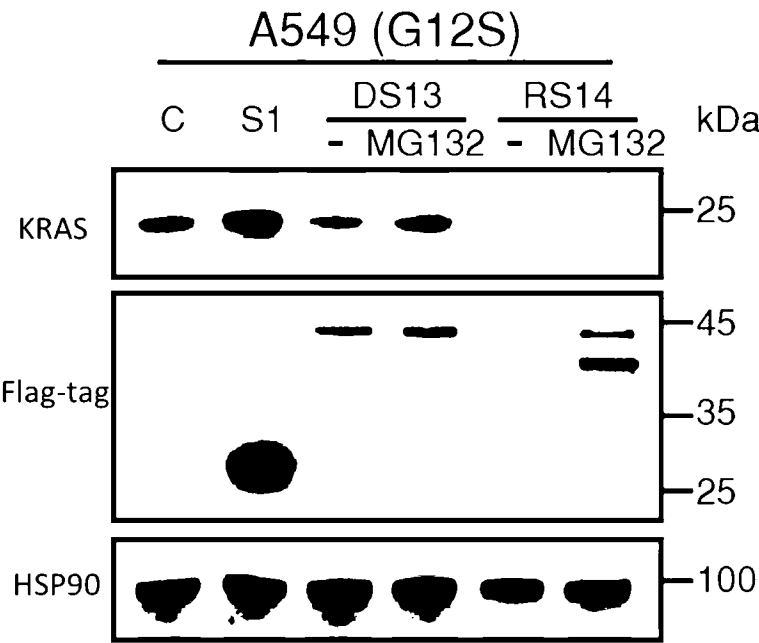


图 3

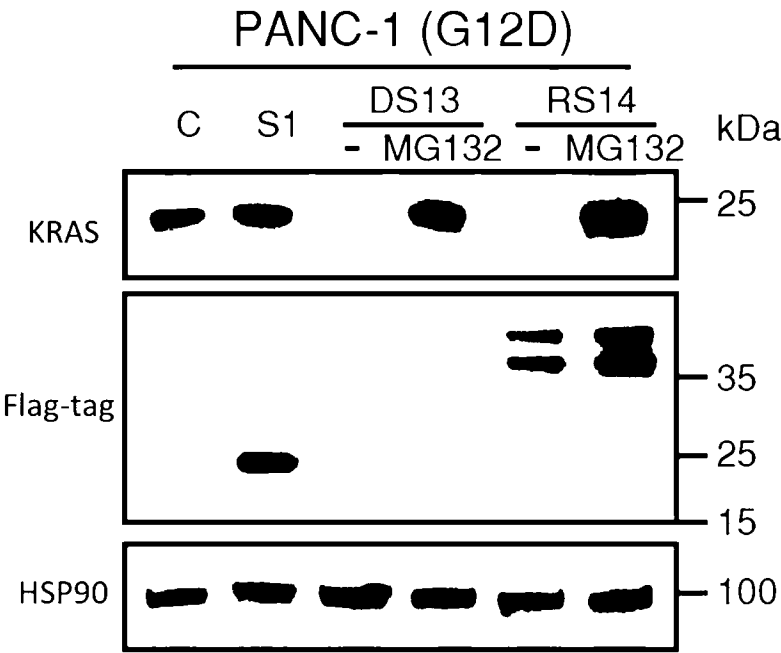


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/099965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K19/00(2006.01)i; C12N15/85(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K, C12N, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Baidu Scholar, Patents, 中国生物序列检索系统, China Biological Sequence Search System, NCBI Genbank, EBI, STNext: 申请人, applicant, 发明人, inventor, 序列1, 8, 11, sequences 1, 8 and 11, Raf-1, Raf1, chimeric protein, degradat+, 降解, 嵌合蛋白, KRAS, RBD, E3, ubiquitin, 泛素连接酶, PROTAC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2022106869 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 27 May 2022 (2022-05-27) description, page 4, paragraph 2	1-10
Y	NCBI. "GenBank: KAF6475884.1" <i>Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase [Rousettus aegyptiacus]</i> , 07 August 2020 (2020-08-07), sequences	1-10
Y	PAN, T. et al. "A Recombinant Chimeric Protein Specifically Induces Mutant KRAS Degradation and Potently Inhibits Pancreatic Tumor Growth" <i>Oncotarget</i> , Vol. 28, No. (7), 14 June 2016 (2016-06-14), no. 44299, pages 1-11	1-10
Y	马怡晖等 (MA, Yihui et al.). "靶向敲减Ras癌蛋白融合型泛素连接酶E3的构建 (Construction of Chimeric E3s Expression Plasmids Targeting Oncoprotein Ras)" <i>中国医学科学院学报 (Acta Academiae Medicinae Sinicae)</i> , Vol. 34, No. (4), 30 August 2012 (2012-08-30), pp. 313-318	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 December 2023

Date of mailing of the international search report

21 December 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/099965

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015192339 A1 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 23 December 2015 (2015-12-23) entire document	1-10
A	WO 2021229221 A2 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 18 November 2021 (2021-11-18) entire document	1-10
A	CN 114867752 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 05 August 2022 (2022-08-05) entire document	1-10
A	李倩等 (LI, Qian et al.). "E3泛素连接酶接头蛋白SPOP抑制前列腺癌的研究进展 (Research Progress on the Negative Role of E3 Ubiquitin Ligase Adaptor SPOP in the Development of Prostate Cancer)" <i>复旦学报(医学版) (Fudan University Journal of Medical Sciences)</i> , Vol. 47, No. (6), 30 November 2020 (2020-11-30), pp. 929-937	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/099965

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions 1-7 relate to the technical solutions involved in claim 1 in which KRAS binding domains are RAF1(52-188), ARAF, PIP5K1A, RASSF2, APP, KRAS and RAF1, respectively. The same technical features of inventions 1-7 are: a chimeric ubiquitin ligase for targeted degradation of KRAS, the chimeric ubiquitin ligase comprising a KRAS binding domain and an E3 ubiquitin ligase-binding protein, which features are disclosed in the prior art (WO 2022106869 A1). Therefore, inventions 1-7 described above do not have a same or corresponding special technical feature, and do not comply with PCT Rule 13.2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **the technical solution in claims 1-10 involving RAF1(52-188)**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/099965

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2022106869	A1	27 May 2022	EP	4247957	A1	27 September 2023
WO	2015192339	A1	23 December 2015	US	10196426	B1	05 February 2019
WO	2021229221	A2	18 November 2021	None			
CN	114867752	A	05 August 2022	MX	2022005241	A	27 July 2022
				BR	112022008201	A2	12 July 2022
				CA	3159745	A1	06 May 2021
				KR	20220091559	A	30 June 2022
				WO	2021087338	A1	06 May 2021
				AU	2020376928	A1	19 May 2022
				EP	4051715	A1	07 September 2022
				EP	4051715	A4	15 November 2023
				JP	2022554304	A	28 December 2022

A. 主题的分类 C07K19/00(2006.01)i; C12N15/85(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07K, C12N, A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) VEN,CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Patents, 中国生物序列检索系统, NCBI Genbank, EBI, STNext: 申请人, 发明人, 序列1,8,11, Raf-1, Raf1, chimeric protein, degradat+, 降解, 嵌合蛋白, KRAS, RBD, E3, ubiquitin, 泛素连接酶, PROTAC		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2022106869 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 说明书第4页第2段	1-10
Y	NCBI. "GenBank: KAF6475884.1" Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase [Rousettus aegyptiacus], 2020年8月7日 (2020 - 08 - 07), 序列部分	1-10
Y	PAN, T.等. "A recombinant chimeric protein specifically induces mutant KRAS degradation and potentially inhibits pancreatic tumor growth" ONCOTARGET, 第28卷, 第7期, 2016年6月14日 (2016 - 06 - 14), 第44299篇, 第1-11页	1-10
Y	马怡晖等. "靶向敲减Ras癌蛋白融合型泛素连接酶E3的构建" 中国医学科学院学报, 第34卷, 第4期, 2012年8月30日 (2012 - 08 - 30), 第313-318页	1-10
A	WO 2015192339 A1 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 2015年12月23日 (2015 - 12 - 23) 全文	1-10
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年12月7日		国际检索报告邮寄日期 2023年12月21日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		授权官员 奚静 电话号码 (+86) 010-53961974

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2021229221 A2 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 2021年11月18日 (2021 - 11 - 18) 全文	1-10
A	CN 114867752 A (加利福尼亚大学董事会) 2022年8月5日 (2022 - 08 - 05) 全文	1-10
A	李倩等. "E3泛素连接酶接头蛋白SPOP抑制前列腺癌的研究进展" 复旦学报(医学版), 第47卷, 第6期, 2020年11月30日 (2020 - 11 - 30), 第929-937页	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

第III栏

缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

发明1-7为权利要求1涉及的KRAS结合结构域分别为RAF1(52-188)、ARAF、PIP5K1A、RASSF2、APP、KRAS或RAF1的技术方案。发明1-7相同的技术特征为：靶向降解KRAS的嵌合泛素连接酶，包括KRAS结合结构域和E3泛素连接酶结合蛋白，其已被现有技术公开（WO2022106869A1）。因此，上述发明1-7不具备相同或相应的特定技术特征，不符合PCT细则第13条（2）的要求。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：权利要求1-10中涉及RAF1(52-188)的技术方案。

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/099965

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2022106869	A1	2022年5月27日	EP	4247957	A1	2023年9月27日
WO	2015192339	A1	2015年12月23日	US	10196426	B1	2019年2月5日
WO	2021229221	A2	2021年11月18日	无			
CN	114867752	A	2022年8月5日	MX	2022005241	A	2022年7月27日
				BR	112022008201	A2	2022年7月12日
				CA	3159745	A1	2021年5月6日
				KR	20220091559	A	2022年6月30日
				WO	2021087338	A1	2021年5月6日
				AU	2020376928	A1	2022年5月19日
				EP	4051715	A1	2022年9月7日
				EP	4051715	A4	2023年11月15日
				JP	2022554304	A	2022年12月28日