

说明书

MG53 突变体及其制备方法和用途

5 技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体地，本申请涉及一种 MG53 突变体、包含所述 MG53 突变体的药物组合物、编码所述 MG53 突变体的核酸、所述 MG53 突变体的制备方法、以及 MG53 突变体在制备用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的药物中的用途。

背景技术

Mitsugumin 53 (MG53) 又称为 TRIM72，是三结构域蛋白 (Tripartite motif-containing Proteins, TRIM) 家族中的一员。MG53 由 N 端的 TRIM 结构域和 C 端的 SPRY 结构域组成，TRIM 结构域由依次相连的 Ring、B-box、coiled-coil 结构域组成 (参见 Chuanxi Cai et al., *the Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284 (5), 3314-3322 (2009))。MG53 主要表达在横纹肌中，对于骨骼肌和心脏甚至整个机体的稳态维持发挥着重要作用。之前发现，MG53 具有细胞修复功能和心脏保护功能 (参见，例如，Chuanxi Cai et al., *Nature Cell Biology*, Vol. 11, 56-64 (2009); CN101797375B)。另外，进一步的研究发现，在缺血预适应 (ischemic preconditioning, IPC) 和缺血后适应 (ischemic postconditioning, PostC) 中，MG53 也是起保护作用的重要分子之一，MG53 分子的两端可以分别与 Caveolin-3 以及 p85-PI3K 激酶相互结合形成复合物，并激活下游的再灌损伤保护激酶 (reperfusion injury salvage kinase, RISK) 途径，从而实现心肌的保护作用 (参见，Chun-Mei Cao et al., *Circulation* 121, 2565-2574, (2010))。

虽然 MG53 具有细胞修复功能和心脏保护功能，但是之前的研究还发现，MG53 具有 E3 泛素连接酶活性，参与调控胰岛素抵抗和代谢综合征的发生发展。MG53 N 端的 TRIM 结构域中的 Ring 结构域具有 E3 泛素连接酶活性，可以与胰岛素受体 (insulin receptor, IR) 及胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate-1, IRS1) 结合，并介导它们的泛素化修饰和蛋白酶体途径的降解，进而阻遏胰岛素信号通路，导致以胰岛素抵抗为发病核心环节的肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等代谢类疾病 (参见，例如，

R. Song et al., *Nature* 494, 375-379, (2013); J.S.Yi et al., *Nature communications* 4, 2354 (2013)）。由此可见，野生型 MG53 在修复细胞、保护心脏的同时，会引起胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等代谢类疾病的副作用，这些副作用是人们所不希望的。

5

发明概述

本申请涉及一种 MG53 突变体、包含所述 MG53 突变体的药物组合物、编码所述 MG53 突变体的核酸、所述 MG53 突变体的制备方法以及 MG53 突变体在制备用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、
10 肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的药物中的用途，特别地，所述 MG53 突变体在具有细胞修复功能和/或心脏保护功能的同时，能够避免或减少野生型 MG53 所带来的胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等代谢类副作用。

一方面，本申请涉及一种 MG53 突变体，其中所述 MG53 突变体在野生型 MG53 的氨基酸序列的基础上，在所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 区域内具有至少一个丝氨酸缺失和/或突变为任何其他非丝氨酸或苏氨酸的氨基酸。在某些实施方式中，
15 所述 coiled-coil-SPRY 区域位于野生型 MG53 的氨基酸序列的第 122-477 位氨基酸区域。在某些实施方式中，所述野生型 MG53 来源于动物，优选地，来源于哺乳动物，例如，人、小鼠、大鼠、猴子、猪、狗等。在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:
20 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、SEQ ID NO: 142 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 MG53 突变体在野生型 MG53 的氨基酸序列的基础上，在所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 区域内有至少一个丝氨酸突变为非极性氨基酸。在某些实施方式中，所述非极性氨基酸选自下组：甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸。优选地，在某些实施方式中，
25 所述非极性氨基酸为丙氨酸。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体在野生型 MG53 的氨基酸序列的基础上，在所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 区域内有至少一个丝氨酸突变为除丝氨酸和苏氨酸之外的极性氨基酸。在某些实施方式中，所述极

性氨基酸选自下组：谷氨酰胺、半胱氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。优选地，在某些实施方式中，所述极性氨基酸为半胱氨酸。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、
5 第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 139 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、
10 第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 140 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、
15 第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 141 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、
20 第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 142 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、
25 第 269 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 的第 188 位、第 189 位、第 210 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、

第 253 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 367 位、第 377 位、第 418 位、第 430 位或者第 440 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列
5 SEQ ID NO: 3 的第 150 位、第 188 位、第 189 位、第 210 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 253 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 367 位、第 377 位、第 418 位、第 430 位、第 440 位、第 464 位或者第 474 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列
10 SEQ ID NO: 4 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位或者第 464 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列
15 SEQ ID NO: 5 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 411 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位或者第 474 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列
20 SEQ ID NO: 6 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 367 位、第 377 位、第 418 位、第 425 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如，SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID
25 NO:142)的第 150 位、第 188-189 位、第 210-211 位、第 214 位、第 246 位、第 253-255 位、第 269 位、第 296-297 位、第 301 位、第 305-307 位、第 314 位、第 341 位、第 367 位、第 377 位、第 405 位、第 411 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位、第 440 位、第 464 位或者第 474 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如, SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID NO:142)的第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 253-255 位、第 269 位、
5 第 296 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 341 位、第 377 位、第 418 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如, SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID
10 NO:142)的第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 253-255 位、第 269 位、第 296 位或者第 297 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如, SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID
15 NO:142)的第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位或者第 297 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如, SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID
20 NO:142)的第 253-255 位中的一个或多个位点。在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列的第 253 位。在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列的第 255 位。在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 的第 255 位。在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID
25 NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142 的第 255 位。

在某些实施方式中,所述 MG53 突变体具有两个或两个以上的丝氨酸突变。在某些实施方式中,所述 MG53 突变体的两个或两个以上的丝氨酸突变包括在第 253-255 位中的一个或多个位点上的丝氨酸突变。在某些实施方式中,所述 MG53 突变体的两

个或两个以上的丝氨酸突变包括在第 253 位的丝氨酸突变。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的两个或两个以上的丝氨酸突变包括在第 255 位的丝氨酸突变。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的两个或两个以上的丝氨酸突变包括在第 253 位和第 255 位的丝氨酸突变。

5 本领域技术人员可以理解，不同物种的野生型 MG53 蛋白中丝氨酸所处位点可能有所不同，因此发生缺失或突变的丝氨酸位点也可能有所不同。在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于 SEQ ID NO:1 所示野生型 MG53 的氨基酸序列中相应丝氨酸位点的上游或下游的 1 至 10 个氨基酸之内、1 至 5 个氨基酸之内、或 1 至 3 个氨基酸之内。

10 在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149 或者 SEQ ID NO: 150 所示的氨基酸序列。优选地，在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15
15 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149、SEQ ID NO: 150 所示的氨基酸序列之一具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、或者至少 99% 的氨基酸序列同源性，并且所述 MG53 突变体在具有细胞修复功能和/或心脏保护功能的同时，避免了野生型 MG53 所带来的代谢类副作用。

20 另一方面，本申请涉及一种药物组合物，其包括所述 MG53 突变体和药学上可接受的载体。

 另一方面，本申请涉及一种分离的核酸，其包含编码所述 MG53 突变体的氨基酸序列的核酸序列。在某些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 13-18 所示的任一核酸序列。在某些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 151-154 所示的任一核酸序列。

25 另一方面，本申请涉及一种表达载体，其包含编码所述 MG53 突变体的氨基酸序列的核酸序列。在某些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 13-18 所示的任一核酸序列。在某些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 151-154 所示的任一核酸序列。

另一方面，本申请涉及一种宿主细胞，其包含本申请所述的表达载体。

另一方面，本申请涉及一种所述 MG53 突变体的制备方法，其包括：确定需要进行突变的丝氨酸的一个或多个位置，对包含编码野生型 MG53 氨基酸序列的核酸序列的质粒的全长序列进行在所述位置的定点突变，将所述定点突变的质粒转染到宿主细胞，表达所述宿主细胞以产生所述 MG53 突变体。在某些实施方式中，所述定点突变包括如下步骤：（1）确定需要定点突变的氨基酸在 cDNA 序列中相应的核苷酸位置，根据突变后的氨基酸修改突变位置的核苷酸序列，并截取包含突变位置的长度为 20-40bp 的序列设计引物；（2）以野生型 MG53 质粒为模板，使用步骤（1）中设计的引物进行 PCR 反应，PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，并对 PCR 产物进行纯化；（3）步骤（2）中纯化后的 PCR 产物使用核酸限制性内切酶进行酶切反应，并将酶切产物与合适的质粒表达载体进行连接，将连接产物进行细菌感受态细胞的转化，培养。在某些实施方式中，所述定点突变进一步包括如下步骤：（4）挑取步骤（3）所得克隆使用步骤（1）所设计的引物进行菌落 PCR 鉴定，对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，然后进行 DNA 测序鉴定，鉴定出带有所述定点突变的阳性克隆。

另一方面，本申请涉及所述 MG53 突变体在制备用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的药物中的用途。在某些实施方式中，所述药物在治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的同时，避免或减少了代谢类副作用，例如胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等副作用。在某些实施方式中，所述心脏疾病是与心肌损伤相关的疾病，包括但不限于，糖尿病性心脏病、心肌缺血、心脏缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂、心绞痛、心肌炎、冠心病、心包炎。在某些实施方式中，所述糖尿病脑血管疾病包括但不限于，脑动脉硬化、缺血性脑血管病、脑出血、脑萎缩、脑梗塞。在某些实施方式中，所述糖尿病眼部并发症包括但不限于，糖尿病性视网膜病变、糖尿病性白内障、与糖尿病相关的葡萄膜炎、失明。在某些实施方式中，所述糖尿病神经病变包括但不限于，糖尿病周围神经病变。在某些实施方式中，所述肾脏疾病包括但不限于，急性肾小球肾炎、慢性肾小球肾炎、肾病综合征、急性肾损伤、糖尿病肾病等。在某些实施方式中，所述与细胞和/或组织损伤相关疾病包括但不限于与肾脏、脑、肺部、肝脏、心脏、脾脏、消化道的细胞和/

- 或组织损伤相关的疾病、皮肤损伤相关的疾病，例如，脑损伤、肺损伤、脾脏损伤、脾脏破裂、胃溃疡、胃炎、胃穿孔、消化道黏膜损伤、外伤、烧伤、溃疡、黏膜炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、中风、皮肤老化等。在某些实施方式中，本申请涉及 SEQ ID NO: 7 所示的多肽在制备用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的药物中的用途。在某些实施方式中，本申请涉及 SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149 或者 SEQ ID NO: 150 所示的多肽在制备用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的药物中的用途。
- 10 另一方面，本申请涉及一种治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的方法，包括给予需要的对象治疗有效量的所述 MG53 突变体。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体在治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的同时，避免或减少了代谢类副作用，例如胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等副作用。在某些实施方式中，所述心脏疾病是与心肌损伤相关的疾病，包括但不限于，糖尿病性心脏病、心肌缺血、心脏缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂、心绞痛、心肌炎、冠心病、心包炎。在某些实施方式中，所述糖尿病脑血管疾病包括但不限于，脑动脉硬化、缺血性脑血管病、脑出血、脑萎缩、脑梗塞。在某些实施方式中，所述糖尿病眼部并发症包括但不限于，糖尿病性视网膜病变、糖尿病性白内障、与糖尿病相关的葡萄膜炎、失明。在某些实施方式中，所述糖尿病神经病变包括但不限于，糖尿病周围神经病变。在某些实施方式中，所述肾脏疾病包括但不限于，急性肾小球肾炎、慢性肾小球肾炎、肾病综合征、急性肾损伤、糖尿病肾病等。在某些实施方式中，所述与细胞和/或组织损伤相关疾病包括但不限于与肾脏、脑、肺部、肝脏、心脏、脾脏、消化道的细胞和/或组织损伤相关的疾病、皮肤损伤相关的疾病，例如，脑损伤、肺损伤、脾脏损伤、脾脏破裂、胃溃疡、胃炎、胃穿孔、消化道黏膜损伤、外伤、烧伤、溃疡、黏膜炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、中风、皮肤老化等。在某些实施方式中，本申请涉及一种治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的方法，
- 15
- 20
- 25

包括给予需要的对象治疗有效量的 SEQ ID NO: 7 所示的多肽。在某些实施方式中，本申请涉及一种治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的方法，包括给予需要的对象治疗有效量的 SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149 或者 SEQ ID NO: 5 150 所示的多肽。

另一方面，本申请涉及用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的 MG53 突变体。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体在治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的同时，避免了代谢类副作用，例如胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等副作用。在某些实施方式中，所述心脏疾病是与心肌损伤相关的疾病，包括但不限于，糖尿病性心脏病、心肌缺血、心脏缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂、心绞痛、心肌炎、冠心病、心包炎。在某些实施方式中，所述糖尿病脑血管疾病包括但不限于，脑动脉硬化、缺血性脑血管病、脑出血、脑萎缩、10 脑梗塞。在某些实施方式中，所述糖尿病眼部并发症包括但不限于，糖尿病性视网膜病变、糖尿病性白内障、与糖尿病相关的葡萄膜炎、失明。在某些实施方式中，所述糖尿病神经病变包括但不限于，糖尿病周围神经病变。在某些实施方式中，所述肾脏疾病包括但不限于，急性肾小球肾炎、慢性肾小球肾炎、肾病综合征、急性肾损伤、糖尿病肾病等。在某些实施方式中，所述与细胞和/或组织损伤相关疾病包括但不限于20 与肾脏、脑、肺部、肝脏、心脏、脾脏、消化道的细胞和/或组织损伤相关的疾病、皮肤损伤相关的疾病，例如，脑损伤、肺损伤、脾脏损伤、脾脏破裂、胃溃疡、胃炎、胃穿孔、消化道黏膜损伤、外伤、烧伤、溃疡、黏膜炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、中风、皮肤老化等。在某些实施方式中，本申请涉及用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的 SEQ ID NO: 7 所示的多肽。在某些实施方式中，本申请涉及用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的 SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149 或者 SEQ ID NO: 150 所示的多肽。25

附图说明

图 1 显示野生型 MG53 的分子结构模式图。

图 2 显示人野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 19。

图 3 显示小鼠野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 20。

图 4 显示大鼠野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 21。

图 5 显示猴子野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 4 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 22。

图 6 显示猪野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 5 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 23。

图 7 显示狗野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 6 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 24。

图 8 显示人 MG53 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 7 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 13。

图 9 显示小鼠 MG53 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 8 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 14。

图 10 显示大鼠 MG53 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 15。

图 11 显示猴子 MG53 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 10 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 16。

图 12 显示猪 MG53 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 11 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 17。

图 13 显示狗 MG53 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 18。

图 14 显示在新生大鼠的原代培养的心肌细胞中使用腺病毒过表达小鼠野生型 MG53 和小鼠 MG53 S255A 突变体后，细胞内 ATP 量和 LDH 释放量。上图为在新生大鼠的原代培养的心肌细胞中使用腺病毒过表达小鼠野生型 MG53 和小鼠 MG53 S255A 突变体，经缺氧复氧处理后检测细胞内的 ATP 的含量，Adv-β-gal 表示表达半乳糖苷酶而不表达小鼠野生型 MG53 及小鼠 MG53 S255A 突变体的对照病毒，

Adv-MG53-myc 表示表达小鼠野生型 MG53 的腺病毒, Adv-MG53-S255A-myc 表示表达小鼠 MG53 S255A 突变体的腺病毒 ($n=7$, $*p<0.05$, $**p<0.01$); 下图为在新生大鼠的原代培养的心肌细胞中使用腺病毒过表达小鼠野生型 MG53 和 MG53 S255A 突变体, 经缺氧复氧处理后检测细胞的 LDH 的释放量, Adv- β -gal 表示表达半乳糖苷酶而不表达小鼠野生型 MG53 及小鼠 MG53 S255A 突变体的对照病毒, Adv-MG53-myc 表示表达小鼠野生型 MG53 的腺病毒, Adv-MG53-S255A-myc 表示表达小鼠 MG53 S255A 突变体的腺病毒 ($n=7$, $**p<0.01$, $***p<0.005$)。

图 15 显示小鼠 MG53 S255A 突变不影响小鼠野生型 MG53 对 AKT 的激活。上图为在新生大鼠的原代培养的心肌细胞中使用腺病毒过表达小鼠野生型 MG53 和小鼠 MG53 S255A 突变体, 蛋白质印迹法 (Western Blot) 检测细胞内的 p-AKT⁴⁷³ 的量, β -gal 表示表达半乳糖苷酶而不表达小鼠野生型 MG53 及小鼠 MG53 S255A 突变体的对照腺病毒, MG53 表示表达小鼠野生型 MG53 的腺病毒, S255A 表示表达小鼠 MG53 S255A 突变体的腺病毒; 下图为上图的统计图, Adv β -gal 表示表达半乳糖苷酶而不表达小鼠野生型 MG53 及 MG53 S255A 突变体的对照腺病毒, Adv MG53 表示表达小鼠野生型 MG53 的腺病毒, Adv MG53 S255A 表示表达小鼠 MG53 S255A 突变体的腺病毒 ($n=5$, $*p<0.05$)。

图 16 显示小鼠 MG53 S255A 突变抑制了 MG53 介导的底物降解。图 16A 的上图是在 HEK293T 细胞系中过表达 IRS1 和小鼠野生型 MG53、小鼠 MG53 S255A 突变体、或小鼠 MG53-D-RING 截短体的质粒, Western Blot 检测 IRS1 的蛋白含量, CON 表示不表达小鼠野生型 MG53、小鼠 MG53 S255A 突变体、小鼠 MG53-D-RING 截短体的空载体质粒对照, MG53 表示表达小鼠野生型 MG53 的载体质粒, S255A 表示表达小鼠 MG53 S255A 突变体的载体质粒, D-RING 表示表达小鼠 RING 结构域切除的 MG53 截短体 MG53-D-RING 的载体质粒; 图 16A 的下图是上图的统计图 ($n=5$, $*p<0.05$; $**p<0.01$); 图 16B 的上图是在 HEK293T 细胞系中过表达 IR 和小鼠野生型 MG53、小鼠 MG53 S255A 突变体、或小鼠 MG53-D-RING 截短体的质粒, Western Blot 检测 IR 的蛋白含量, CON 表示不表达小鼠野生型 MG53、小鼠 MG53 S255A 突变体、小鼠 MG53-D-RING 截短体的空载体质粒对照, MG53 表示表达小鼠野生型 MG53 的载体质粒, S255A 表示表达小鼠 MG53 S255A 突变体的载体质粒, D-RING 表示表达

小鼠 MG53-D-RING 截短体的载体质粒；图 16B 的下图是上图的统计图（ $n=5$ ， $**p<0.01$ ）。

图 17 显示人 MG53 S255A 突变体抑制了 MG53 介导的底物降解。上图是在 HEK293T 细胞系中过表达 IRS1 和人野生型 MG53、人 MG53 S255A 突变体、或人 MG53-D-RING 截短体的质粒，Western Blot 检测 IRS1 的蛋白含量，CON 表示不表达人野生型 MG53、人 MG53 S255A 突变体、人 MG53-D-RING 截短体的空载体质粒对照，MG53 表示表达人野生型 MG53 的载体质粒，MG53-dR 表示表达人 MG53-D-RING 截短体的载体质粒；下图是上图的统计图（ $n=5$ ， $**p<0.01$ ）。

图 18 显示小鼠 MG53 S255A 突变体抑制了 MG53 与底物 IRS1 的结合。图 18A 显示 HEK293T 细胞系中共表达小鼠野生型 MG53 和 MG53 的底物 IRS1，或者共表达小鼠 MG53 S255A 突变体和 MG53 的底物 IRS1，然后免疫沉淀 IRS1 蛋白并进行 Western Blot 实验检测 MG53-IRS1 复合物的含量。图 18A 中的 MG53 表示小鼠野生型 MG53，MG53 S255A 表示小鼠 MG53 S255A 突变体，IRS1 表示小鼠胰岛素受体底物；图 18B 在表面等立体共振 (SPR) 实验中，固定纯化的蛋白 IRS1，检测它对流动相中的纯化蛋白小鼠野生型 MG53 或小鼠 MG53 S255A 突变体的结合强度。图 18B 中的 MG53 表示小鼠野生型 MG53，MG53-S255A 表示小鼠 MG53 S255A 突变体，Rat IRS1 表示大鼠胰岛素受体底物。

图 19 显示小鼠 MG53 S255A 突变体对 IRS1 蛋白量的影响。上图是在 HEK293T 细胞系中过表达 IRS1、Ub、MG53、MG53 S255A 突变体的质粒，Western Blot 检测 IRS1 的蛋白含量。Ub 表示泛素，MG53 表示小鼠野生型 MG53，MG53-S255A 表示小鼠 MG53 S255A 突变体；下图为上图实验的统计图，CON 表示不表达小鼠野生型 MG53 和小鼠 MG53 S255A 突变体的空载体质粒对照，MG53 表示表达小鼠野生型 MG53 的载体质粒，MG53-S255A 表示表达小鼠 MG53 S255A 突变体的载体质粒（ $n=3$ ， $*p<0.05$ ； $***p<0.005$ ）。

图 20 显示人 MG53 亚型的氨基酸序列 SEQ ID NO: 139（其对应的 NCBI 编号为 BAD18630.1）及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 143。

图 21 显示人 MG53 亚型的氨基酸序列 SEQ ID NO: 140（其对应的 NCBI 编号为 XP_016878743.1）及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 144。

图 22 显示人 MG53 亚型的氨基酸序列 SEQ ID NO: 141（其对应的 NCBI 编号为 BAC03506.1）及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 145。

图 23 显示人 MG53 亚型的氨基酸序列 SEQ ID NO: 142（其对应的 NCBI 编号为 AAH33211.1）及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 146。

5 图 24 显示人 MG53 亚型 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 147 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 151。

图 25 显示人 MG53 亚型 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 148 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 152。

图 26 显示人 MG53 亚型 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 149 及其编码核
10 酸序列 SEQ ID NO: 153。

图 27 显示人 MG53 亚型 S255A 突变体的氨基酸序列 SEQ ID NO: 150 及其编码核酸序列 SEQ ID NO: 154。

图 28 显示本申请中各物种的全长 MG53 蛋白及其片段的氨基酸位点的命名示意图。

15 发明详述

尽管本申请将在以下公开多个方面和实施方式，但是在不违背本申请主题精神和范围的前提下，本领域技术人员显然可以对其进行各种等同改变和修改。本申请公开的多个方面和实施方式仅用于举例说明，其并非旨在限制本申请，本申请的实际保护范围以权利要求为准。除非另外指出，本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本
20 发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本申请中引用的所有参考文献、专利、专利申请均通过整体引用并入本文。

一方面，本申请涉及一种 MG53 突变体，其中所述 MG53 突变体在野生型 MG53 的氨基酸序列的基础上，在所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 区域内具有至少一个丝氨酸缺失和/或突变为任何其他非丝氨酸或苏氨酸的氨基酸。

25 本申请中使用的术语“野生型 MG53”或“野生型 MG53 蛋白”是指在对象体内表达的全长 MG53 蛋白的天然序列或其片段。MG53 蛋白是一种多功能蛋白，其结构如图 1 所示。各物种的全长 MG53 蛋白长度略有不同，但是通常具有约 477 个氨基酸，由 N 端的 TRIM 结构域和 C 端的 SPRY 结构域组成，TRIM 结构域由依次相连的 Ring、

B-box、coiled-coil 结构域（RBCC）组成。MG53 蛋白是膜修复的重要组成部分之一，在缺血再灌注损伤的预适应保护和后适应保护中发挥重要作用，同时 MG53 蛋白的高表达也会引起胰岛素抵抗和代谢综合征的发生。关于 MG53 的结构、功能以及与其他蛋白的相互作用，本领域中已有详细报道（参见，例如，Chuanxi Cai et al., *Journal of Biological Chemistry*, 284 (5), 3314-3322, (2009); Xianhua Wang et al., *Circulation Research* 107, 76-83, (2010); Eun Young Park et al., *Proteins*, 790-795 (2009)）。

本申请中使用的术语“对象”包括人类和非人类的动物。非人类的动物包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物。“对象”也可以是家畜动物，例如牛、猪、羊、家禽和马；或啮齿类动物，例如大鼠、小鼠；或灵长类动物，例如猿、猴子；或家养动物，例如狗和猫。“对象”可以是雄性或者雌性，可以是老年、成年、青少年、儿童或者婴儿。人类“对象”可以是高加索人、非洲人、亚洲人、闪族人，或其他种族或所述种族背景的混合。

在某些实施方式中，所述野生型 MG53 优选地来源于哺乳动物，例如，人、猿、猴子、小鼠、大鼠、猪、狗等。本领域技术人员可以通过公开渠道（例如，美国国家生物技术信息中心网站（NCBI））获得各物种的野生型 MG53 的氨基酸序列，各物种的野生型 MG53 的氨基酸序列通过引用并入本申请。在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 或者 SEQ ID NO: 6 所示，分别对应于人、小鼠、大鼠、猴子、猪、狗等的野生型 MG53 全长蛋白。

本申请中使用的术语“蛋白”、“多肽”以及“肽”可以互换使用，是指氨基酸的聚合物。本申请所述的蛋白、多肽或肽可以含有天然的氨基酸，也可以含有非天然的氨基酸，或氨基酸的类似物、模拟物。本申请所述的蛋白、多肽或肽可以通过本领域公知的任何方法获得，例如但不限于，通过天然分离、重组表达、化学合成等。

本申请中使用的术语“coiled-coil-SPRY 结构域”是野生型 MG53 的氨基酸序列中对应的一个结构域。coiled-coil 结构域（即，卷曲螺旋结构域）存在于大多数 TRIM 家族蛋白中，该结构域介导 TRIM 家族成员之间或者 TRIM 成员与其他蛋白之间的同源性或者异源性结合形成二聚体、多聚体等复合物，从而发挥细胞修复功能（参见，例如，Ozato et al., *Nature Review Immunology*, 8: 849-860 (2008); Sanchez S. et al., *PNAS*, 111:

2494-2499 (2014))。SPRY 结构域位于野生型 MG53 的氨基酸序列的 C 端,通常位于野生型 MG53 第 288-477 位氨基酸区域。在某些实施方式中,本申请中所述的 SPRY 结构域包括 PRY 基序和 SPRY 基序。SPRY 结构域在进化上非常保守,从真菌到高等动物中均有表达(参见,例如, Ozato et al., *Nature Review Immunology*, 8: 849-860 (2008))。迄今为 5 止,在不同哺乳动物基因组内鉴定到的大约 60 个 TRIM 家族成员中,15 个成员在 TRIM 结构域(即 Ring-B-box-Coiled-Coil 结构域)之后携带一个类似的 SPRY 结构域,且 MG53 表现出与这些 TRIM 亚家族蛋白的保守性一级结构(参见,例如 WO2009/073808)。Coiled-coil-SPRY 结构域对应的具体氨基酸区域位点在不同物种中可能略有不同,但是本领域技术人员可以通过本领域的现有技术(例如,NCBI 10 中公开的内容)和/或常规实验方法得到不同物种的野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域所对应的具体氨基酸区域位点。在某些实施方式中,本申请中的 coiled-coil-SPRY 结构域是指野生型 MG53 的第 122-477 位氨基酸或者与其结构类似的区域。在某些实施方式中,所述结构类似区域可以是包括第 122-477 位氨基酸中的 70%、80%或者 90%的连续的氨基酸序列的区域。在某些实施方式中,所述结构类似区域的 N 端起始位点可以比第 122-477 位氨基酸区域的 N 端增长或者缩短约 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、15 个或者 20 个氨基酸,和/或者其 C 端终止位点可以比第 122-477 位氨基酸区域的 C 端增长或者缩短约 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、15 个或者 20 个氨基酸。例如,在某些实施方式中,本申请中的 coiled-coil-SPRY 结构域是指人的野生型 MG53(即,SEQ ID NO: 20 1)中的 coiled-coil-SPRY 结构域,其对应于 SEQ ID NO:1 的第 122-477 位氨基酸。

本申请中使用的术语“MG53 突变体”或者“MG53 蛋白突变体”是指野生型 MG53 蛋白的天然氨基酸序列被修饰的 MG53 蛋白变体或片段。这类修饰包括但不限于一个或多个氨基酸缺失和/或被取代。在某些实施方式中,本申请中的 MG53 突变体在野生型 MG53 的氨基酸序列的基础上,在所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内 25 具有至少一个丝氨酸缺失和/或突变为任何其他非丝氨酸或苏氨酸的氨基酸。

本申请中使用的“至少一个丝氨酸”是指一个或多个丝氨酸。例如,是指野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、

20 个、21 个、22 个、23 个、24 个、25 个、26 个、27 个、28 个、29 个、30 个、31 个、32 个、33 个、34 个、35 个或更多个丝氨酸。

本申请中使用的“其他非丝氨酸或苏氨酸的氨基酸”是指除了丝氨酸、苏氨酸之外的、任何其他的天然氨基酸、取代的天然氨基酸、非天然氨基酸、取代的非天然氨基酸或其任何组合。天然氨基酸的名称在本申请中表示为标准的单字母或三字母代码。天然氨基酸包括非极性氨基酸和极性氨基酸。除非另有说明，本文所述的任何氨基酸可以是 D-或 L-构型。

在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸 (Ser 或 S) 缺失或者突变为非极性氨基酸。所述非极性氨基酸包括甘氨酸 (Gly 或 G)、丙氨酸 (Ala 或 A)、亮氨酸 (Leu 或 L)、异亮氨酸 (Ile 或 I)、缬氨酸 (Val 或 V)、脯氨酸 (Pro 或 P)、苯丙氨酸 (Phe 或 F)、甲硫氨酸 (Met 或 M)、色氨酸 (Trp 或 W)。在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸缺失或者突变为甘氨酸或丙氨酸。优选地，在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸缺失或者突变为丙氨酸。更优选地，在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸突变为丙氨酸。

在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸缺失或者突变为极性氨基酸。所述极性氨基酸包括谷氨酰胺 (Gln 或 Q)、半胱氨酸 (Cys 或 C)、天冬酰胺 (Asn 或 N)、酪氨酸 (Tyr 或 Y)、天冬氨酸 (Asp 或 D)、谷氨酸 (Glu 或 E)、赖氨酸 (Lys 或 K)、精氨酸 (Arg 或 R)、组氨酸 (His 或 H)。在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸缺失或者突变为半胱氨酸或组氨酸。优选地，在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸缺失或者突变为半胱氨酸。更优选地，在某些实施方式中，所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸突变为半胱氨酸。

在某些实施方式中，本申请所述的丝氨酸突变包括一个丝氨酸被一个或多个非丝氨酸或苏氨酸的其他氨基酸取代，例如，一个丝氨酸可以被 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个非丝氨酸或苏氨酸的其他氨基酸取代。如果有两

个或两个以上丝氨酸被取代，则每个丝氨酸可以分别独立地被一个或多个非丝氨酸或苏氨酸的其他氨基酸取代。

虽然各物种野生型 MG53 的具体丝氨酸位点随着物种的不同而可能有所不同，但是一旦已知某物种野生型 MG53 的氨基酸序列及其 coiled-coil-SPRY 结构域对应的氨基酸区域，本领域技术人员就可以确定 coiled-coil-SPRY 结构域内的丝氨酸所对应的具体氨基酸位点。例如，本领域技术人员已知人野生型 MG53 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，其 coiled-coil-SPRY 结构域对应于 SEQ ID NO: 1 的第 122-477 位氨基酸。在这种情况下，本领域技术人员就可以确定人野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的丝氨酸所对应的具体氨基酸位点分别位于 SEQ ID NO: 1 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于人野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，本申请所述的 MG53 蛋白包括全长 MG53 蛋白，或者全长 MG53 蛋白的截短体（即全长 MG53 蛋白的截短的片段），或者是与全长 MG53 蛋白或其截短体相比具有一个或多个氨基酸突变或者增加或者删除的突变体。在这种情况下，为了统一不同的 MG53 蛋白亚型的氨基酸序列中的氨基酸位点数的命名，当本申请中提到某一 MG53 蛋白亚型的氨基酸位点时，将该 MG53 蛋白亚型的氨基酸序列与全长 MG53 蛋白的氨基酸序列（例如，SEQ ID NO:1）进行序列对比，并在必要时在相关氨基酸序列中引入间隔，使相同的氨基酸数目达到最多，将该 MG53 亚型的氨基酸序列的第 1 个氨基酸的位点数指定为该氨基酸对应的全长 MG53 蛋白的氨基酸位点数，从而使得当提及某物种野生型 MG53 的氨基酸位点数时，不管是全长 MG53 蛋白还是其截短体，均指的是全长 MG53 蛋白的氨基酸序列中的位点数。

例如，如图 28 所示，某物种的全长 MG53 蛋白具有 n 个氨基酸，对应的氨基酸位点为第 1- n 位。MG53 亚型 1 的氨基酸序列与全长 MG53 蛋白的氨基酸序列相比，含有对应于全长序列的第 m - n 位氨基酸的截短体，那么就将 MG53 亚型 1 的氨基酸序列的第 1 个氨基酸的位点数指定为第 m 位，将 MG53 亚型 1 的氨基酸序列的第 2 个氨基酸的位点数指定为第 $m+1$ 位，以此类推，将 MG53 亚型 1 的氨基酸序列的最后一个氨基酸位点指定为第 n 位。再例如，MG53 亚型 2 的氨基酸序列与全长 MG53 蛋白的氨基酸序列相比，含有对应于全长序列的第 1- s 位氨基酸的截短体，那么就将 MG53 亚型 2 的氨基酸序列的第 1 个氨基酸的位点数指定为第 1 位，将 MG53 亚型 2 的氨基酸序列的第 2 个氨基酸的位点数指定为第 2 位，以此类推，将 MG53 亚型 2 的氨基酸序列的最后一个氨基酸位点指定为第 s 位。再例如，MG53 亚型 3 的氨基酸序列与全长 MG53 蛋白的氨基酸序列相比，含有对应于全长序列的第 p - q 位氨基酸的截短体，那么就将 MG53 亚型 3 的氨基酸序列的第 1 个氨基酸的位点数指定为第 p 位，将 MG53 亚型 3 的氨基酸序列的第 2 个氨基酸的位点数指定为第 $p+1$ 位，以此类推，将 MG53 亚型 3 的氨基酸序列的最后一个氨基酸位点指定为第 q 位。

例如，SEQ ID NO: 140 是人的野生型 MG53 亚型之一，其具有 333 个氨基酸，对应于人野生型 MG53 全长序列 SEQ ID NO: 1 的第 145-477 位氨基酸片段，在这种情况下，将 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列的第 1 个氨基酸(蛋氨酸)位点指定为 SEQ ID NO: 140 的第 145 位，第 2 个氨基酸位点指定为 SEQ ID NO: 140 的第 146 位，以此类推，将 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列的最后一个氨基酸位点指定为 SEQ ID NO: 140 的第 477 位。又例如，SEQ ID NO: 141 是人的野生型 MG53 亚型之一，其也具有 333 个氨基酸，与人野生型 MG53 全长序列 SEQ ID NO: 1 第 145-477 位氨基酸相比只有 1 个氨基酸不同，即 SEQ ID NO: 1 的第 315 位为谷氨酸，而 SEQ ID NO: 141 的相应位置为甘氨酸，在这种情况下，将 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列的第 1 个氨基酸(蛋氨酸)位点指定为 SEQ ID NO: 141 的第 145 位，第 2 个氨基酸位点指定为 SEQ ID NO: 141 的第 146 位，以此类推，将 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列的最后一个氨基酸位点指定为 SEQ ID NO: 141 的第 477 位。再例如，SEQ ID NO: 142 是人的野生型 MG53 亚型之一，其具有 269 个氨基酸，对应于人野生型 MG53 全长序列 SEQ ID NO: 1 的第 1-269 位氨基酸片段，在这种情况下，将 SEQ ID NO: 142 的氨基酸序列的第 1 个氨基酸(蛋氨酸)位点指定为 SEQ ID NO: 142 的第 1 位，将 SEQ ID NO: 142 的氨基酸序列的第 2

个氨基酸位点指定为 SEQ ID NO: 142 的第 2 位，以此类推，将 SEQ ID NO: 142 的氨基酸序列的最后一个氨基酸位点指定为 SEQ ID NO: 142 的第 269 位。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于人野生型 MG53 亚型的氨基酸序列 SEQ ID NO: 139 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于人野生型 MG53 亚型的氨基酸序列 SEQ ID NO: 140 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于人野生型 MG53 亚型的氨基酸序列 SEQ ID NO: 141 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位或者第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于人野生型 MG53 亚型的氨基酸序列 SEQ ID NO: 142 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于小鼠野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 的第 188 位、第 189 位、第 210 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 253 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 367 位、第 377 位、第 418 位、第 430 位、第 440 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于大鼠野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的第 150 位、第 188 位、第 189 位、第 210 位、第 211 位、第 214 位、

第 246 位、第 253 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 367 位、第 377 位、第 418 位、第 430 位、第 440 位、第 464 位、第 474 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于猴子野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 4 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 306 位、第 307 位、第 341 位、第 377 位、第 405 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位、第 464 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于猪野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 5 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 377 位、第 411 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位、第 474 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于狗野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 6 的第 150 位、第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 297 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 314 位、第 341 位、第 367 位、第 377 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位中的一个或多个位点。

虽然发生缺失或突变的具体丝氨酸位点随着物种的不同而可能有所不同，但是野生型 MG53 蛋白的丝氨酸位点在各物种之间具有高度保守性。例如，对于人、小鼠、大鼠、猴子、猪、狗等的野生型 MG53 蛋白而言，各自野生型 MG53 蛋白的氨基酸序列的第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 341 位、第 377 位、第 418 位、第 430 位均是丝氨酸。在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列（例如，SEQ ID NOs: 1-6）的第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 341 位、第 377 位、第 418 位、第 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列（例如，SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID

NO:142) 的第 150 位、第 188-189 位、第 210-211 位、第 214 位、第 246 位、第 253-255 位、第 269 位、第 296-297 位、第 301 位、第 305-307 位、第 314 位、第 341 位、第 367 位、第 377 位、第 405 位、第 411 位、第 418 位、第 425 位、第 430 位、第 440 位、第 464 位或者第 474 位中的一个或多个位点。

5 在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如, SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID NO:142) 的第 189 位、第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 253-255 位、第 269 位、第 296 位、第 301 位、第 305 位、第 307 位、第 341 位、第 377 位、第 418 位或者第
10 430 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如, SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID NO:142) 的第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 253-255 位、第 269 位、第 296 位或者
15 者第 297 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如, SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID NO:142) 的第 211 位、第 214 位、第 246 位、第 255 位、第 269 位、第 296 位或者第
20 297 位中的一个或多个位点。

在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列(例如, SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141、或者 SEQ ID NO:142) 的第 253-255 位中的一个或多个位点。在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列的第 253 位。在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列的第 255 位。在某些实施方式中,发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 的第 255 位。在
25

某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于野生型 MG53 的氨基酸序列 SEQ ID NO: 139、SEQ ID NO: 140、SEQ ID NO: 141 或 SEQ ID NO: 142 的第 255 位。

在某些实施方式中，所述 MG53 突变体具有两个或两个以上的丝氨酸突变。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的两个或两个以上的丝氨酸突变包括在第 253-255 5 位中的一个或多个位点上的丝氨酸突变。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的两个或两个以上的丝氨酸突变包括在第 253 位的丝氨酸突变。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的两个或两个以上的丝氨酸突变包括在第 255 位的丝氨酸突变。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的两个或两个以上的丝氨酸突变包括在第 253 位和第 255 位的丝氨酸突变。

10 本领域技术人员可以理解，不同物种的野生型 MG53 蛋白中丝氨酸所处位点可能有所不同，因此发生缺失或突变的丝氨酸位点也可能有所不同。在某些实施方式中，发生缺失或突变的丝氨酸位于 SEQ ID NO:1 所示野生型 MG53 的氨基酸序列中相应丝氨酸位点的上游或下游的 1 至 10 个氨基酸之内、1 至 5 个氨基酸之内、或 1 至 3 个氨基酸之内。

15 在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149 或者 SEQ ID NO: 150。更优选地，在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、20 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149、SEQ ID NO: 150 所示的序列之一具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、或至少 99% 的氨基酸序列同源性，并且所述 MG53 突变体在具有细胞修复功能和/或心脏保护功能的同时，避免了野生型 MG53 所带来的代谢类副作用。

25 “序列同源性”的百分比定义为，针对氨基酸序列而言，将候选氨基酸序列与对比氨基酸序列进行序列对比，并在必要时引入间隔，使相同的氨基酸数目达到最多，并在此基础上计算两条氨基酸序列之间相同氨基酸的百分比；针对核酸序列而言，将候

选核酸序列与对比核酸序列进行序列对比，并在必要时引入间隔，使相同的核苷酸数目达到最多，并在此基础上计算两条核酸序列之间相同核苷酸的百分比。

可以通过本领域所知的多种方式来对比以确定同源性的百分比。例如，可以用公开可用的以下工具进行序列对比，所述工具如 BLASTp（美国国家生物技术信息中心网站（NCBI）：<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>，也可参见，Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)）、ClustalW2（欧洲生物信息研究所网站：<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>，可参见，Higgins D.G. et al., Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al., Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007))和 Toffee(瑞士生物信息学研究所网站,可参见, Poirrot O. et al., Nucleic Acids Res., 31(13): 3503-6 (2003); Notredame C. et al., J. Mol. Biol., 302(1): 205-17 (2000))。使用软件进行序列比对时，可以使用软件提供的默认参数，也可以根据对比的需要适当调整参数，这些都在本领域技术人员的知识范围之内。

在某些实施方式中，SEQ ID NOs: 7-12、SEQ ID NOs: 147-150 以及与 SEQ ID NOs: 7-12、SEQ ID NOs: 147-150 具有氨基酸序列同源性的 MG53 突变体在具有细胞修复功能和/或心脏保护功能的同时，避免或减少了野生型 MG53 所带来的代谢类副作用。

本申请的发明人惊奇地发现，野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内至少一个丝氨酸缺失或突变为任何其他非丝氨酸或苏氨酸的氨基酸后，能够避免或减少野生型 MG53 所带来的代谢类副作用，但是并不影响 MG53 的细胞修复功能和/或心脏保护功能。不希望受到任何理论的束缚，上述结果可能是由于野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的丝氨酸位点的磷酸化能大幅度调控 MG53 的 E3 泛素连接酶功能，并通过底物 IR β 和 IRS1 调节 MG53 对胰岛素信号系统的调控作用，但是该结构域内的丝氨酸位点的磷酸化并不调控 MG53 的细胞修复功能和/或心脏保护功能。

本申请中使用的“细胞修复功能”是指，在细胞损伤时，特别是在细胞急性损伤时，野生型 MG53 或 MG53 突变体能够对损伤细胞的细胞膜进行修补恢复，可选的，通过激活相关信号途径（例如，RISK 途径）来减少细胞死亡，促进细胞生存，从而使细胞恢复功能。在某些实施方式中，本申请的野生型 MG53 或 MG53 突变体可以修复活的细胞、体外的细胞、或者体内的细胞。本申请的野生型 MG53 或 MG53 突变体还可以

- 修复不同种类的细胞，例如，但不限于，心肌细胞、横纹肌细胞、骨骼肌细胞、肾近端肾小管上皮细胞、肺泡上皮细胞、消化道上皮细胞（例如，口腔上皮细胞、食管上皮细胞、胃上皮细胞、十二指肠上皮细胞、小肠上皮细胞、空肠上皮细胞、回肠上皮细胞、结肠上皮细胞）、粘膜细胞（例如，口腔粘膜细胞、鼻粘膜细胞、胃黏膜细胞、小肠粘膜细胞、结肠黏膜细胞、十二指肠黏膜细胞）、皮肤细胞（例如表皮细胞、上皮细胞、真皮细胞、内皮细胞）、血管细胞（例如血管壁细胞、血管内皮细胞、血管外皮细胞、血管平滑肌细胞）等。在某些实施方式中，本申请提供的野生型 MG53 或 MG53 突变体可以修复心肌细胞、骨骼肌细胞、横纹肌细胞、肾近端肾小管上皮细胞、肺泡上皮细胞等。
- 5 可以使用本领域公知的方法来测定本申请所述的 MG53 突变体的细胞修复功能。例如通过在乳鼠心肌细胞（NRVM）中使用腺病毒过表达野生型 MG53 和本申请所述的 MG53 突变体，利用缺氧刺激细胞，检测细胞的存活状况（例如，通过 MTT 法、培养基的 ATP 和 LDH 浓度测定法、TUNEL 染色法等检测（具体操作步骤参见 Zhang. T et al. Nature Medicine, 175-184,(2016)），然后比较对照组（例如，不表达野生型 MG53、MG53 突变体的空载体阴性对照组、过表达野生型 MG53 的阳性对照组）和实验组（即，过表达本申请所述的 MG53 突变体的组）的观测指标（例如，细胞内 ATP 水平、LDH 的释放水平等），来测定本申请所述的 MG53 突变体的细胞修复功能。
- 10 15

- 本申请中所述的“心脏保护功能”是指，在心肌损伤时，特别是在心肌急性损伤时，野生型 MG53 或 MG53 突变体能够通过对心肌细胞膜损伤的修复，可选的，通过激活心肌细胞的相关信号途径（例如，RISK 途径）从而实现对心肌细胞的保护，进而提高心脏保护作用。可以使用本领域公知的方法来测定本申请所述的 MG53 突变体的心脏保护功能。例如通过在乳鼠心肌细胞（NRVM）中过表达野生型 MG53 和本申请所述的 MG53 突变体，利用缺氧刺激细胞，检测细胞的存活状况（例如，通过 MTT 法、培养基的 ATP 和 LDH 浓度测定法、TUNEL 染色法等检测（具体操作步骤参见 Zhang. T et al. Nature Medicine, 175-184,(2016)），然后比较对照组（例如，不表达野生型 MG53、MG53 突变体的空载体阴性对照组、过表达野生型 MG53 的阳性对照组）和实验组（即，过表达本申请所述的 MG53 突变体的组）的观测指标（例如，细胞内 ATP 水平、LDH 的释放水平等），来考察本申请所述的 MG53 突变体的心脏保护功能。又例如，分别使用野生型 MG53 和本申请所述的 MG53 突变体蛋白孵育心肌细胞，利用各种刺激（例
- 20 25

如，缺氧、H₂O₂) 引导细胞的死亡，通过比较对照组（例如，既不用野生型 MG53、又不用 MG53 突变体孵育的阴性对照组、过表达野生型 MG53 的阳性对照组）和实验组（即，用本申请所述的 MG53 突变体孵育的组）的细胞存活率来评价本申请所述的 MG53 突变体的心脏保护功能。细胞存活率可以通过 MTT 细胞计数、LDH、ATP 或者 TUNEL 染色的测量来确定。

本申请中所述的“代谢类副作用”是指，在应用了治疗量的药物后所出现的治疗目的之外的、由于代谢紊乱所引起的疾病或不适，包括但不限于，胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等。不希望受到任何理论的束缚，但是认为可以通过测定 MG53 的 E3 泛素连接酶功能来评价代谢类副作用的严重程度。在某些实施方式中，当野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸缺失或突变为任何其他非丝氨酸或苏氨酸的氨基酸后，会抑制野生型 MG53 至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%、甚至 100% 的 E3 泛素连接酶功能，从而避免或减少野生型 MG53 产生的代谢类副作用，但是并不影响 MG53 的细胞修复功能和/或心脏保护功能。“避免或减少野生型 MG53 产生的代谢类副作用”是指完全没有出现野生型 MG53 产生的代谢类副作用或者代谢类副作用的严重程度比相应的野生型 MG53 产生的代谢类副作用降低至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%、甚至 100%。“不影响 MG53 的细胞修复功能和/或心脏保护功能”是指 MG53 的细胞修复功能和/或心脏保护功能完全没有受到影响或者 MG53 的细胞修复功能和/或心脏保护功能降低了至多 5%、至多 10%、至多 15%、至多 20%、至多 25%、至多 30% 等。

在某些实施方式中，本申请提供的 MG53 突变体包含其类似物。所述 MG53 突变体类似物指的是一种多肽，其具有的功能或结构特征与本申请提供的 MG53 突变体的全部或部分基本相似，但是所述 MG53 突变体类似物的氨基酸序列与野生型 MG53 的氨基酸序列至少在一个氨基酸位点不同。所述 MG53 突变体类似物可以是 MG53 突变体的部分片段、衍生物或变体，并可以包含化学或生物的修饰。所述 MG53 突变体类似物可以具有 MG53 突变体的一个或多个氨基酸的保守替换、增加、删除、插入、截断、修饰（例如，磷酸化、糖基化、标记等）或其任意组合。MG53 突变体类似物可以包括 MG53 突变体天然存在的变体和人工产生的变体，如通过重组方法或化学合成

获得的人工多肽序列。MG53 突变体类似物可以包含非天然存在的氨基酸残基。本领域技术人员可以理解，本申请所述的 MG53 突变体的类似物仍然保留了与 MG53 突变体基本上相似的功能，例如，MG53 突变体的类似物在具有细胞修复功能和/或心脏保护功能的同时，能够避免或减少野生型 MG53 所带来的代谢类副作用，例如，胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等。

氨基酸残基的保守替换是指性质相似的氨基酸之间的替换，例如极性氨基酸之间的替换（如谷氨酰胺和天冬酰胺之间的替换），疏水性氨基酸之间的替换（如亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸和缬氨酸之间的替换），以及带相同电荷的氨基酸之间的替换（如精氨酸、赖氨酸和组氨酸之间的替换，或者谷氨酸和天冬氨酸之间的替换）等。在某些实施方式中，本申请所述的 MG53 突变体与 SEQ ID NOs: 7-12、SEQ ID NOs: 147-150 所示序列相比，仅在非丝氨酸的一个或多个氨基酸位点有氨基酸的保守替换。在某些实施方式中，本申请所述的 MG53 突变体与 SEQ ID NOs: 7-12、SEQ ID NOs: 147-150 所示序列相比，在非丝氨酸的 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、15 个、或 20 个氨基酸位点有氨基酸的保守替换。

在不影响活性的前提下，本申请所述的 MG53 突变体还可以含有非天然的氨基酸。非天然的氨基酸包括例如， β -氟代丙氨酸、1-甲基组氨酸、 γ -亚甲基谷氨酸、 α -甲基亮氨酸、4,5-脱氢赖氨酸、羟基脯氨酸、3-氟代苯基丙氨酸、3-氨基酪氨酸、4-甲基色氨酸等。

本申请的 MG53 突变体也可以使用本领域公知的方法进行修饰。例如，但不限于，PEG 化、糖基化、氨基端修饰、脂肪酰化、羧基端修饰、磷酸化、甲基化等。

本领域技术人员可以理解，本申请的 MG53 突变体使用本领域公知的方法进行修饰之后，仍然保留了与 MG53 突变体基本上相似的功能，例如，经修饰的 MG53 突变体在具有细胞修复功能和/或心脏保护功能的同时，能够避免或减少野生型 MG53 所带来的代谢类副作用，例如，胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等。

另一方面，本申请涉及一种药物组合物，其包括本申请所述的 MG53 突变体和药学上可接受的载体。

本申请中使用的术语“药学上可接受的载体”是指，用于给给药对象递送 MG53 突变体的药学上可接受的溶剂、悬浮剂或任何其它药理上惰性的媒介物，其不干扰 MG53

突变体的结构和性质。某些此类载体能使 MG53 突变体配制成例如片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆液、混悬液和锭剂以给给药对象口服摄入。某些此类载体能使 MG53 突变体配制成注射、输注或局部给药。

可以用在本申请的药物组合物中的药学上可接受的载体包括，但不限于，例如，
5 药学可接受的液体、凝胶、或固体载剂、水相介质（例如，氯化钠注射液，林格氏液注射液，等渗葡萄糖注射液，无菌水注射液，或葡萄糖和乳酸林格注射液）、非水相介质（例如，植物来源的不挥发性油、棉花子油、玉米油、芝麻油、或者花生油）、抗微生物物质、等渗物质（例如氯化钠或葡萄糖）、缓冲液（例如磷酸盐或枸橼酸盐缓冲液）、抗氧化剂（例如硫酸氢钠）、麻醉剂（例如盐酸普鲁卡因）、悬浮剂/分散
10 剂（例如羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、或聚乙烯吡咯烷酮）、螯合剂（例如 EDTA（乙二胺四乙酸）或 EGTA（乙二醇双（2-氨基乙基醚）四乙酸））、乳化剂（例如聚山梨醇酯 80（吐温-80））、稀释剂、佐剂、辅料、或无毒辅助物质，其他本领域公知的组分、或以上的多种组合。适用的组分可包括，例如，填充剂、粘合剂、崩解剂、缓冲液、防腐剂、润滑剂、搅味剂、增稠剂、着色剂或乳化剂。

15 在某些实施方式中，所述的药物组合物为口服制剂。口服制剂包括，但不限于，胶囊、囊剂、药丸、片剂、锭剂（用于味道的基底，通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶）、粉末、颗粒剂、或者是水或非水溶液或悬浮液、或者油包水或水包油的乳剂、或者是酞剂或糖浆、或者是糖果锭剂（适用惰性基质，如白明胶和甘油，或蔗糖或者阿拉伯胶）和/或漱口药及其类似物。

20 在某些实施方式中，口服的固体制剂（如胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、颗粒等）中包括所述的 MG53 突变体与一种或多种药学上可接受的载体，如柠檬酸钠或磷酸二钙，和/或以下物质：（1）填料或者补充剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇，和/或硅酸；（2）粘合剂，例如，羧甲基纤维素、藻朊酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖、和/或阿拉伯胶；（3）湿润剂，例如，丙三醇；（4）分裂剂，
25 例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或者木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐、与碳酸钠，（5）阻滞剂溶液，例如石蜡；（6）加速吸收剂，例如季铵化合物；（7）润滑剂，例如，乙酰醇与单硬脂酸甘油酯；（8）吸收剂，例如高岭土与皂土；（9）润滑剂，例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、及其混合物；与（10）着色剂。

在某些实施方式中，口服的液体制剂包括药学可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、悬浮剂、糖浆剂和酏剂等。除了 MG53 突变体之外，液体剂型还可以含有常用的惰性稀释剂，例如，水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂，如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯（甲）酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类（特别地，棉籽油、花生油、玉米油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脂肪酸山梨醇酯、以及混合物。除了惰性稀释液之外，口服组合物也可以添加佐剂例如，润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、颜料、香料和防腐剂。

在某些实施方式中，所述的药物组合物为注射制剂。注射制剂包括无菌水溶液或分散液、混悬剂或乳剂。在所有情况下，所述的注射制剂应当无菌且应当是液体以方便注射。它在生产和贮存条件下应保持稳定，并应当抗微生物（例如细菌和真菌）的污染。载体可以是一种溶剂或分散介质，其包含，例如，水、乙醇、多羟基化合物（例如，甘油、丙二醇，以及液体聚乙二醇等）及其适当的混合物和/或植物油。所述的注射制剂应保持适当的流动性，适当的流动性可通过多种方式维持，例如，通过使用如卵磷脂等涂层，使用表面活性剂等。可以通过加入各种抗菌和抗真菌剂（例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等）来实现抗微生物污染。

在某些实施方式中，所述的药物组合物为口腔喷雾制剂或鼻腔喷雾制剂。所述喷雾制剂包括，但不限于，水性气雾剂、非水性悬浮液、脂质体制剂或者固体颗粒制剂等。水性气雾剂是通过将作用剂的水性溶液或者悬浮液和常规的药学上可接受的载体与稳定剂一同配制。该载体与稳定剂根据特定化合物的需要而变化，但是其一般包括非离子型表面活性剂（吐温类、或聚乙二醇）、油酸、卵磷脂、氨基酸如甘氨酸，缓冲液、盐、糖或者糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备，可以通过喷雾器递送。

在某些实施方式中，所述的药物组合物可以和一种或多种其他药物混合使用。在某些实施方式中，所述的组合物包含至少一种其他药物。在某些实施方式中，所述的其他药物为心血管类药物、用于治疗肾脏疾病的药物或者用于细胞修复的药物等。

在某些实施方式中，所述的药物组合物可以通过适当的途径递送到给药对象中，包括但不限于，通过口服途径、注射途径（如静脉注射、肌肉注射、皮下注射、皮内注射、心内注射、鞘内注射、胸膜腔内注射、腹腔内注射等）、粘膜途径（如鼻腔内给药、口腔内给药等）、舌下途径、直肠途径、经皮途径、眼内途径、肺部途径。在某些实施方式中，所述的药物组合物可通过注射途径给药。

另一方面，本申请涉及一种分离的核酸，其包含编码本申请所述 MG53 突变体的氨基酸序列的核酸序列。

本申请中使用的术语“分离的”是指一种物质（例如多肽或者核酸）与它在自然界中正常存在的环境相分离或存在于与它在自然界中正常存在的环境不同的环境中。

5 本申请使用的术语“核酸”或“多聚核苷酸”指核糖核酸（RNA）、脱氧核糖核酸（DNA）、或核糖核酸-脱氧核糖核酸的混合物如 DNA-RNA 杂交物。核酸或多聚核苷酸可以是单链或双链 DNA 或 RNA 或 DNA-RNA 杂交物。核酸或多聚核苷酸可以是线性的或环状的。本申请使用的术语“编码”或“为……编码”指能够转录为 mRNA 和/或翻译为肽或蛋白。“编码序列”或“基因”指编码 mRNA、肽或蛋白的多聚核苷酸序列。在
10 本申请中这两个术语可以互换使用。

在某些实施方式中，所述分离的核酸包含 SEQ ID NO: 13-18 所示的任一核酸序列。

SEQ ID NO: 13 是编码 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 8。

SEQ ID NO: 14 是编码 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参
15 见图 9。

SEQ ID NO: 15 是编码 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 10。

SEQ ID NO: 16 是编码 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 11。

20 SEQ ID NO: 17 是编码 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 12。

SEQ ID NO: 18 是编码 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 13。

25 在某些实施方式中，所述分离的核酸包含 SEQ ID NO: 151-154 所示的任一核酸序列。

SEQ ID NO: 151 是编码 SEQ ID NO: 147 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 24。

SEQ ID NO: 152 是编码 SEQ ID NO: 148 所示氨基酸序列的核酸序列, 其具体序列参见图 25。

SEQ ID NO: 153 是编码 SEQ ID NO: 149 所示氨基酸序列的核酸序列, 其具体序列参见图 26。

5 SEQ ID NO: 154 是编码 SEQ ID NO: 150 所示氨基酸序列的核酸序列, 其具体序列参见图 27。

在某些实施方式中, 本申请提供的分离的核酸包含与 SEQ ID NOs: 13-18、SEQ ID NOs: 151-154 所示的任一核酸序列具有至少 70%同源性的核酸序列, 例如, 至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、或至少 99%的同源性, 并且仍能编码
10 SEQ ID NOs: 7-12、SEQ ID NOs: 147-150 所示的氨基酸序列之一。

在某些实施方式中, 本申请提供了编码 SEQ ID NOs: 7-12、SEQ ID NOs: 147-150 的核酸序列, 但其核酸序列由于遗传密码的简并性而不同于 SEQ ID NOs: 13-18、SEQ ID NOs: 151-154 所示的任一核酸序列。

本申请中使用的术语“遗传密码的简并性”是指, 同一种氨基酸具有两个或更多个
15 对应的密码子的现象。例如, 脯氨酸具有 4 个同义密码子 CCU、CCC、CCA、CCG。本领域公知, 由于核酸遗传密码的简并性, 可以将某已知核酸序列中的某些位置的核酸进行替换, 但却不改变编码的氨基酸序列。本领域技术人员可以很容易地进行遗传密码简并性的替换, 例如, 通过碱基的定点突变技术。不同生物体对不同的密码子的偏好性存在区别, 为在某个选定的生物细胞内表达本申请的多肽, 可以选择该生物细
20 胞所偏好的密码子, 获得相应的编码序列, 通过重组表达得到本申请的 MG53 突变体序列 (例如 SEQ ID NOs: 7-12、SEQ ID NOs: 147-150)。

另一方面, 本申请涉及一种表达载体, 其包含本申请所述的 MG53 突变体的氨基酸序列的编码序列。

本申请中的表达载体可以是, 例如, DNA 质粒、细菌质粒、病毒等。表达载体的
25 非限制性例子为如 Paul 等, 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee 等, 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; 以及 Novina 等, 2002, Nature Medicine, advance online publication doi: 10.1038/nm725 中所描述的。所述表达载体中可以进一步含有启动子, 其与所述 MG53 突变体的氨基酸序

列的编码序列操作性连接，使得当所述表达载体进入宿主细胞后，所述启动子能够启动编码序列的表达。表达载体可以通过适当的方法导入宿主细胞，例如，但不限于，磷酸钙转染、脂质体转染、电穿孔转染、细菌热休克等，具体的方法请参见，Sambrook等人编著的“分子克隆”（实验手册，冷泉港，1989）。在某些实施方式中，本申请

5 所述的表达载体包含 SEQ ID NO: 13-18 所示的任一核酸序列。

另一方面，本申请涉及一种宿主细胞，其包含本申请所述的表达载体。

本申请中所述的宿主细胞可以是真核细胞，也可以是原核细胞。适当的真核细胞可以包括，例如，哺乳动物细胞，如中国仓鼠卵巢细胞（CHO）。适当的原核细胞可以包括，例如，细菌，如大肠杆菌。

10 另一方面，本申请涉及所述 MG53 突变体的制备方法，本申请提供的 MG53 突变体可以通过本领域的已知技术来制备。例如，可以通过化学合成方法制备，也可以通过基因工程方法制备。

化学合成方法主要包括固相合成和液相合成两种方法。固相多肽合成方法包括，例如 Merrifield 固相合成法，该方法已详细记载在文献“Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154”和“M. Bodanszky 等人, "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Second Edition, 1976”以及“J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983”中。在此通过引用方式将这些文献全文并入到本申请中用作参考。Merrifield 固相合成法主要包括以下步骤，根据目标多肽的氨基酸序列，先使被保护的羧基末端氨基酸与树脂连接；连接后洗涤树脂；脱去羧基末端氨基酸 α 15 氨基上的保护基（例如，叔丁氧羰基），脱去这个保护基的时候必须要确保不断裂该氨基酸和树脂间的连接键；然后在所得的树脂上偶联倒数第二个羧基末端被保护的氨基酸，进行这一偶联时，在第二个氨基酸的游离羧基和连在树脂上的第一个氨基酸的氨基之间形成一个酰胺键；根据目标多肽的氨基酸连接顺序，依次重复前述反应过程，直到所有氨基酸都连接到树脂上；最后，从树脂上切落被保护的肽，脱去保护基即可 20 得到目标多肽。本申请的多肽也可以通过液相合成方法制备，例如可以用标准的溶液肽合成法制备，该方法已详细记载在文献“E. Schroder and K. Kubke, "The Peptides", Vol. 1, Academic Press (New York), 1965”中。在此通过引用方式将该文献全文并入到本申请中用作参考。液相合成法主要包括，利用形成酰胺键的化学或酶方法分步偶联氨基酸

25

或肽片段。

基因工程方法为利用编码相应 MG53 突变体的核酸序列在适合的宿主细胞中表达生成相应突变体的方法。有关该方法的详细描述可参考 Sambrook 等人编著的“分子克隆”（实验手册，冷泉港，1989）。在某些实施方式中，本申请涉及的所述 MG53 突变体的制备方法包括确定需要进行突变的丝氨酸的一个或多个位置，对包含编码野生型 MG53 氨基酸序列的核酸序列的质粒的全长序列进行在所述位置的定点突变，将所述定点突变的质粒转染到宿主细胞，表达所述宿主细胞以产生所述 MG53 突变体。

本申请中使用的术语“定点突变”是指，向目的 DNA 片段中引入感兴趣的变化，包括碱基的添加、删除、替换等。在某些实施方式中，所述目的 DNA 片段为野生型 MG53 的编码序列 SEQ ID NOs:19-24、SEQ ID NOs: 143-146，引入突变的位点位于所述野生型 MG53 的 coiled-coil-SPRY 结构域的编码序列中的一个或多个丝氨酸位点。

SEQ ID NO: 19 是编码 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 2。

SEQ ID NO: 20 是编码 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 3。

SEQ ID NO: 21 是编码 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 4。

SEQ ID NO: 22 是编码 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 5。

SEQ ID NO: 23 是编码 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 6。

SEQ ID NO: 24 是编码 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 7。

SEQ ID NO: 143 是编码 SEQ ID NO: 139 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 20。

SEQ ID NO: 144 是编码 SEQ ID NO: 140 所示氨基酸序列的核酸序列，其具体序列参见图 21。

SEQ ID NO: 145 是编码 SEQ ID NO: 141 所示氨基酸序列的核酸序列,其具体序列参见图 22。

SEQ ID NO: 146 是编码 SEQ ID NO: 142 所示氨基酸序列的核酸序列,其具体序列参见图 23。

5 在某些实施方式中,所述定点突变包括如下步骤:

- (1) 确定需要定点突变的氨基酸在 cDNA 序列中相应的核苷酸位置,根据突变后的氨基酸修改突变位置的核苷酸序列,并截取包含突变位置的长度为 20-40bp 的序列设计引物;
- (2) 以野生型 MG53 质粒为模板,使用步骤(1)中设计的引物进行 PCR 反应,10 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并对 PCR 产物进行纯化;
- (3) 步骤(2)中纯化后的 PCR 产物使用核酸限制性内切酶进行酶切反应,并将酶切产物与合适的质粒表达载体进行连接,将连接产物进行细菌感受态细胞的转化,培养。

在某些实施方式中,所述定点突变进一步包括如下步骤:

- (4) 挑取步骤(3)所得克隆使用步骤(1)所设计的引物进行菌落 PCR 鉴定,15 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,然后进行 DNA 测序鉴定,鉴定出带有所述定点突变的阳性克隆。

可以使用各种市售的定点突变试剂盒对野生型 MG53 进行定点突变,例如参考北京全式金公司的 Easy Mutagenesis System 试剂盒的说明书,其中详细记载了定点突变20 的方法和步骤。

另一方面,本申请涉及所述 MG53 突变体在制备用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的药物中的用途。在某些实施方式中,所述药物在治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细25 胞和/或组织损伤相关疾病的同时,避免或减少了代谢类副作用,例如胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等副作用。在某些实施方式中,所述心脏疾病是与心肌损伤相关的疾病,包括但不限于,糖尿病性心脏病、心肌缺血、心脏缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂、心绞痛、心肌炎、冠心病、心包炎。在某些实施方式中,所述糖尿病脑血管疾病包括但不限于,脑动脉硬化、缺血性脑血

管病、脑出血、脑萎缩、脑梗塞。在某些实施方式中，所述糖尿病眼部并发症包括但不限于，糖尿病性视网膜病变、糖尿病性白内障、与糖尿病相关的葡萄膜炎、失明。

在某些实施方式中，所述糖尿病神经病变包括但不限于，糖尿病周围神经病变。在某些实施方式中，所述肾脏疾病包括但不限于，急性肾小球肾炎、慢性肾小球肾炎、肾病综合征、急性肾损伤、糖尿病肾病等。在某些实施方式中，所述与细胞和/或组织损伤相关疾病包括但不限于与肾脏、脑、肺部、肝脏、心脏、脾脏、消化道的细胞和/或组织损伤相关的疾病、皮肤损伤相关的疾病，例如，脑损伤、肺损伤、脾脏损伤、脾脏破裂、胃溃疡、胃炎、胃穿孔、消化道黏膜损伤、外伤、烧伤、溃疡、黏膜炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、中风、皮肤老化等。在某些实施方式中，本申请涉及 SEQ ID NO: 7 所示的多肽在制备用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的药物中的用途。在某些实施方式中，本申请涉及 SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149 或者 SEQ ID NO: 150 所示的多肽在制备用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的药物中的用途。

另一方面，本申请涉及一种治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的方法，包括给予需要的对象治疗有效量的所述 MG53 突变体。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体在治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的同时，避免或减少了代谢类副作用，例如胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等副作用。在某些实施方式中，所述心脏疾病是与心肌损伤相关的疾病，包括但不限于，糖尿病性心脏病、心肌缺血、心脏缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂、心绞痛、心肌炎、冠心病、心包炎。在某些实施方式中，所述糖尿病脑血管疾病包括但不限于，脑动脉硬化、缺血性脑血管病、脑出血、脑萎缩、脑梗塞。在某些实施方式中，所述糖尿病眼部并发症包括但不限于，糖尿病性视网膜病变、糖尿病性白内障、与糖尿病相关的葡萄膜炎、失明。在某些实施方式中，所述糖尿病神经病变包括但不限于，糖尿病周围神经病变。在某些实施方式中，所述肾脏疾病包括但不限于，急性肾小球肾炎、慢性肾小球肾炎、肾病综合征、急性肾损伤、糖尿病肾病等。在某些实施方式中，

所述与细胞和/或组织损伤相关疾病包括但不限于与肾脏、脑、肺部、肝脏、心脏、脾脏、消化道的细胞和/或组织损伤相关的疾病、皮肤损伤相关的疾病，例如，脑损伤、肺损伤、脾脏损伤、脾脏破裂、胃溃疡、胃炎、胃穿孔、消化道黏膜损伤、外伤、烧伤、溃疡、黏膜炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、中风、皮肤老化等。在某些实施方式中，本申请涉及一种治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的方法，包括给予需要的对象治疗有效量的 SEQ ID NO: 7 所示的多肽。在某些实施方式中，本申请涉及一种治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的方法，包括给予需要的对象治疗有效量的 SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149 或者 SEQ ID NO: 150 所示的多肽。

本申请中使用的术语“治疗有效量”是指，可以实现抑制或缓解对象的疾病或症状，或者可以预防性地抑制或防止疾病或症状发生的药物的量。治疗有效量可以是将对象的一种或多种疾病或症状缓解到一定程度的药物的量；可以将那些跟疾病或症状成因相关的一种或多种生理或生物化学参数部分或完全恢复到正常的药物的量；和/可以降低疾病或症状发生的可能性的药物的量。

另一方面，本申请涉及用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的 MG53 突变体。在某些实施方式中，所述 MG53 突变体在治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的同时，避免了代谢类副作用，例如胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常等副作用。在某些实施方式中，所述心脏疾病是与心肌损伤相关的疾病，包括但不限于，糖尿病性心脏病、心肌缺血、心脏缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、心力衰竭、心律失常、心脏破裂、心绞痛、心肌炎、冠心病、心包炎。在某些实施方式中，所述糖尿病脑血管疾病包括但不限于，脑动脉硬化、缺血性脑血管病、脑出血、脑萎缩、脑梗塞。在某些实施方式中，所述糖尿病眼部并发症包括但不限于，糖尿病性视网膜病变、糖尿病性白内障、与糖尿病相关的葡萄膜炎、失明。在某些实施方式中，所述糖尿病神经病变包括但不限于，糖尿病周围神经病变。在某些实施方式中，所述肾脏疾病包括但不限于，急性肾小球肾炎、慢性肾小球肾炎、肾病综合征、急性肾损伤、

糖尿病肾病等。在某些实施方式中，所述与细胞和/或组织损伤相关疾病包括但不限于与肾脏、脑、肺部、肝脏、心脏、脾脏、消化道的细胞和/或组织损伤相关的疾病、皮肤损伤相关的疾病，例如，脑损伤、肺损伤、脾脏损伤、脾脏破裂、胃溃疡、胃炎、胃穿孔、消化道黏膜损伤、外伤、烧伤、溃疡、黏膜炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、中风、皮肤老化等。在某些实施方式中，本申请涉及用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的 SEQ ID NO: 7 所示的多肽。在某些实施方式中，本申请涉及用于治疗心脏疾病、糖尿病脑血管疾病、糖尿病眼部并发症、糖尿病神经病变、糖尿病足、肾脏疾病、与细胞和/或组织损伤相关疾病的 SEQ ID NO: 147、SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 149 或者 SEQ ID NO: 150 所示的多肽。

具体实施方式

所有实施例中的涉及的生物学材料如大肠杆菌菌株、各种克隆与表达质粒、培养基、工具酶、缓冲液，和各种培养方法、蛋白提取和纯化方法、其它的分子生物学操作方法，均为该领域技术人员所熟悉，可以参考 Sambrook 等人编著的“分子克隆”（实验室手册，冷泉港，1989）及“精编分子生物学实验指南”（美/F.奥斯伯等著，颜子颖等译，北京，科学出版社，1998）。

实施例 1：MG53 突变体的制备

1. 人 MG53 突变体的制备

人 MG53 S255A 突变体

（1）设计突变引物：确定需要点突变的氨基酸在 cDNA 序列中相应核苷酸位置，对照氨基酸密码子表，根据突变后的氨基酸修改突变位置的核苷酸序列，并截取突变位置上游 20bp 和下游 10bp 间的序列设计引物。引物序列如下：

人 MG53 S255A 正向引物： tgcagaagatcctggcagaggctccccacccg (SEQ ID NO: 25)

人 MG53 S255A 反向引物： tccagacgggcgggtgggggagcctctgccagg (SEQ ID NO: 26)

（2）质粒全长克隆的聚合酶链式反应 (PCR)：以原基因表达质粒为模板，使用设计的点突变引物，利用高保真 Taq 酶进行 PCR 反应，整个基因表达质粒。反应体系和反应条件参照如下：

5	template	x μl	95℃	5min	} 30 cycles
	primer-F	0.5 μl	95℃	5min	
	primer-R	0.5 μl	55℃	30sec	
	2×Taq Mix	10 μl	72℃	Ymin	
	ddH2O	9-x μl	72℃	10min	
	total	20μl	4℃	∞	

(3) PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳：PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，以鉴定它的纯度和数量。

10 (4) PCR 产物的乙醇沉淀：对于大小正确且条带单一的 PCR 产物，以乙醇沉淀的方法进行纯化。

(5) Dpn I 酶切：纯化后的 PCR 产物使用核酸限制性内切酶 Dpn I 进行酶切反应。

(6) 酶切产物的转化：对 Dpn I 酶切产物进行细菌感受态细胞的转化，涂布至合适的筛选平板上进行培养。

15 (7) 阳性克隆的鉴定：挑取大小合适克隆进行菌落 PCR 鉴定，对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，对于条带清晰并且大小正确的克隆进行小体积摇菌扩增培养，然后进行测序鉴定。

按照相同的方法制备人 MG53 S255G、S255L、S255V、S255P、S255F、S255W、S255Q、S255C、S255Y、S255D、S255R、S211A、S214A、S246A、S269A、S296A、S297A 突变体。除了突变引物不同之外，其他步骤均与人 MG53 S255A 突变体的制备
20 步骤相同。各突变体的引物如下所示：

(i) 人 MG53 S255G 的正向和反向引物，人 MG53 S255G 表示人的野生型 MG53（即，SEQ ID NO: 1）的第 255 位丝氨酸突变为甘氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S255G 正向引物：tgcagaagatcctggcagagggtccccaccg（SEQ ID NO: 27）

人 MG53 S255G 反向引物：tccagacgggcgggtgggggaccctctgccagg（SEQ ID NO: 28）

25 (ii) 人 MG53 S255L 的正向和反向引物，人 MG53 S255L 表示人的野生型 MG53（即，SEQ ID NO: 1）的第 255 位丝氨酸突变为亮氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S255L 正向引物: tgcagaagatcctggcagagcttccccaccg (SEQ ID NO: 29)

人 MG53 S255L 反向引物: tccagacgggcgggtgggggaagctctgccagg (SEQ ID NO: 30)

(iii) 人 MG53 S255V 的正向和反向引物, 人 MG53 S255V 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为缬氨酸的 MG53 突变体。

5 人 MG53 S255V 正向引物: tgcagaagatcctggcagaggttccccaccg (SEQ ID NO: 31)

人 MG53 S255V 反向引物: tccagacgggcgggtgggggaacctctgccagg (SEQ ID NO: 32)

(iv) 人 MG53 S255P 的正向和反向引物, 人 MG53 S255P 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为脯氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S255P 正向引物: tgcagaagatcctggcagagcctccccaccg (SEQ ID NO: 33)

10 人 MG53 S255P 反向引物: tccagacgggcgggtgggggaggctctgccagg (SEQ ID NO: 34)

(v) 人 MG53 S255F 的正向和反向引物, 人 MG53 S255F 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为苯丙氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S255F 正向引物: tgcagaagatcctggcagagtttccccaccg (SEQ ID NO: 35)

人 MG53 S255F 反向引物: tccagacgggcgggtgggggaaactctgccagg (SEQ ID NO: 36)

15 (vi) 人 MG53 S255W 的正向和反向引物, 人 MG53 S255W 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为色氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S255W 正向引物: tgcagaagatcctggcagagtggccccaccg (SEQ ID NO: 37)

人 MG53 S255W 反向引物: tccagacgggcgggtgggggccactctgccagg (SEQ ID NO: 38)

20 (vii) 人 MG53 S255Q 的正向和反向引物, 人 MG53 S255Q 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为谷氨酰胺的 MG53 突变体。

人 MG53 S255Q 正向引物: tgcagaagatcctggcagagcaacccccaccg (SEQ ID NO: 39)

人 MG53 S255Q 反向引物: tccagacgggcgggtgggggttgctctgccagg (SEQ ID NO: 40)

(viii) 人 MG53 S255C 的正向和反向引物, 人 MG53 S255C 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为半胱氨酸的 MG53 突变体。

25 人 MG53 S255C 正向引物: tgcagaagatcctggcagagtgtccccaccg (SEQ ID NO: 41)

人 MG53 S255C 反向引物: tccagacgggcgggtgggggacactctgccagg (SEQ ID NO: 42)

(ix) 人 MG53 S255Y 的正向和反向引物, 人 MG53 S255Y 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为酪氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S255Y 正向引物: tgcagaagatcctggcagagtatccccaccgc (SEQ ID NO: 43)

5 人 MG53 S255Y 反向引物: tccagacgggcgggtgggggatactctgccagg (SEQ ID NO: 44)

(x) 人 MG53 S255D 的正向和反向引物, 人 MG53 S255D 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为天冬氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S255D 正向引物: tgcagaagatcctggcagaggatccccaccgc (SEQ ID NO: 45)

人 MG53 S255D 反向引物: tccagacgggcgggtgggggactctctgccagg (SEQ ID NO: 46)

10 (xi) 人 MG53 S255R 的正向和反向引物, 人 MG53 S255R 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 255 位丝氨酸突变为精氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S255R 正向引物: tgcagaagatcctggcagagcgtccccaccgc (SEQ ID NO: 47)

人 MG53 S255R 反向引物: tccagacgggcgggtgggggacgtctctgccagg (SEQ ID NO: 48)

15 (xii) 人 MG53 S211A 的正向和反向引物, 人 MG53 S211A 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 211 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S211A 正向引物: ccttgccgcgggagctgggggccctgaactctt (SEQ ID NO: 49)

人 MG53 S211A 反向引物: gctgctccaggttaagagttcaggccccagctcc (SEQ ID NO: 50)

(xiii) 人 MG53 S214A 的正向和反向引物, 人 MG53 S214A 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 214 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

20 人 MG53 S214A 正向引物: gggagctggggagcctgaacgcttacctggagc (SEQ ID NO: 51)

人 MG53 S214A 反向引物: tgccgcagctgctccaggttaagcgttcaggctc (SEQ ID NO: 52)

(xiv) 人 MG53 S246A 的正向和反向引物, 人 MG53 S246A 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 246 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S246A 正向引物: tgaaatactgcctggtgaccgccaggtgcaga (SEQ ID NO: 53)

25 人 MG53 S246A 反向引物: gccaggatcttctgcagcctggcggtcaccagg (SEQ ID NO: 54)

(xv)人 MG53 S269A 的正向和反向引物,人 MG53 S269A 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 269 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S269A 正向引物: aggagctgacctttgacccggcctctgcgcacc (SEQ ID NO: 55)

人 MG53 S269A 反向引物: accaggctcgggtgcgcagaggccgggtcaaag (SEQ ID NO: 56)

5 (xvi)人 MG53 S297A 的正向和反向引物,人 MG53 S297A 表示人的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 1) 的第 297 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

人 MG53 S297A 正向引物: agctgacctttgacccgagcgtgcgcacccga (SEQ ID NO: 57)

人 MG53 S297A 反向引物: accaccaggctcgggtgcgcagcgtcgggtca (SEQ ID NO: 58)

2. 小鼠 MG53 突变体的制备

10 按照人 MG53 S255A 突变体相同的方法制备小鼠 MG53 S255A、S255G、S255L、S255W、S255Q、S255Y、S255D、S255R 突变体。除了突变引物不同之外,其他步骤均与人 MG53 S255A 突变体的制备步骤相同。各突变体的引物如下所示:

(i) 小鼠 MG53 S255A 的正向和反向引物,小鼠 MG53 S255A 表示小鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 2) 的第 255 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

15 小鼠 MG53 S255A 正向引物: tgcagaagatcctgtcagaggcaccaccaccgg (SEQ ID NO: 59)

小鼠 MG53 S255A 反向引物: tctagccttgccgggtggtggtcctctgacagg (SEQ ID NO: 60)

(ii) 小鼠 MG53 S255G 的正向和反向引物,小鼠 MG53 S255G 表示小鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 2) 的第 255 位丝氨酸突变为甘氨酸的 MG53 突变体。

小鼠 MG53 S255G 正向引物: tgcagaagatcctgtcagaggaccaccaccgg (SEQ ID NO: 61)

20 小鼠 MG53 S255G 反向引物: tctagccttgccgggtggtggtcctctgacagg (SEQ ID NO: 62)

(iii) 小鼠 MG53 S255L 的正向和反向引物,小鼠 MG53 S255L 表示小鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 2) 的第 255 位丝氨酸突变为亮氨酸的 MG53 突变体。

小鼠 MG53 S255L 正向引物: tgcagaagatcctgtcagagttaccaccaccgg (SEQ ID NO: 63)

小鼠 MG53 S255L 反向引物: tctagccttgccgggtggtggttaactctgacagg (SEQ ID NO: 64)

25 (iv) 小鼠 MG53 S255W 的正向和反向引物,小鼠 MG53 S255W 表示小鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 2) 的第 255 位丝氨酸突变为色氨酸的 MG53 突变体。

小鼠 MG53 S255W 正向引物: tgcagaagatcctgtcagagtggccaccaccgg (SEQ ID NO: 65)

小鼠 MG53 S255W 反向引物: tctagccttgccggtggtggccactctgacagg (SEQ ID NO: 66)

(v) 小鼠 MG53 S255Q 的正向和反向引物, 小鼠 MG53 S255Q 表示小鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 2) 的第 255 位丝氨酸突变为谷氨酰胺的 MG53 突变体。

5 小鼠 MG53 S255Q 正向引物: tgcagaagatcctgtcagagcaaccaccaccgg (SEQ ID NO: 67)

小鼠 MG53 S255Q 反向引物: tctagccttgccggtggtggttgcctctgacagg (SEQ ID NO: 68)

(vi) 小鼠 MG53 S255Y 的正向和反向引物, 小鼠 MG53 S255Y 表示小鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 2) 的第 255 位丝氨酸突变为酪氨酸的 MG53 突变体。

小鼠 MG53 S255Y 正向引物: tgcagaagatcctgtcagagtaccaccaccgg (SEQ ID NO: 69)

10 小鼠 MG53 S255Y 反向引物: tctagccttgccggtggtggatactctgacagg (SEQ ID NO: 70)

(vii) 小鼠 MG53 S255D 的正向和反向引物, 小鼠 MG53 S255D 表示小鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 2) 的第 255 位丝氨酸突变为天冬氨酸的 MG53 突变体。

小鼠 MG53 S255D 正向引物: tgcagaagatcctgtcagaggatccaccaccgg (SEQ ID NO: 71)

小鼠 MG53 S255D 反向引物: tctagccttgccggtggtggatcctctgacagg (SEQ ID NO: 72)

15 (viii) 小鼠 MG53 S255R 的正向和反向引物, 小鼠 MG53 S255R 表示小鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 2) 的第 255 位丝氨酸突变为精氨酸的 MG53 突变体。

小鼠 MG53 S255R 正向引物: tgcagaagatcctgtcagagcgaccaccaccgg (SEQ ID NO: 73)

小鼠 MG53 S255R 反向引物: tctagccttgccggtggtggcgtctgacagg (SEQ ID NO: 74)

3. 大鼠 MG53 突变体的制备

20 按照人 MG53 S255A 突变体相同的方法制备大鼠 MG53 S255A、S255G、S255L、S255W、S255Q、S255Y、S255D、S255R 突变体。除了突变引物不同之外, 其他步骤均与人 MG53 S255A 突变体的制备步骤相同。各突变体的引物如下所示:

(i) 大鼠 MG53 S255A 的正向和反向引物, 大鼠 MG53 S255A 表示大鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 3) 的第 255 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

25 大鼠 MG53 S255A 正向引物: tgcagaagattctgtcagagcaccacccccag (SEQ ID NO: 75)

大鼠 MG53 S255A 反向引物: tctagccttgctgggggtggtgcctctgacaga (SEQ ID NO: 76)

(ii) 大鼠 MG53 S255G 的正向和反向引物, 大鼠 MG53 S255G 表示大鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 3) 的第 255 位丝氨酸突变为甘氨酸的 MG53 突变体。

大鼠 MG53 S255G 正向引物: tgcagaagattctgtcagaggaccacccccag (SEQ ID NO: 77)

5 大鼠 MG53 S255G 反向引物: tctagccttgctgggggtggtccctctgacaga (SEQ ID NO: 78)

(iii) 大鼠 MG53 S255L 的正向和反向引物, 大鼠 MG53 S255L 表示大鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 3) 的第 255 位丝氨酸突变为亮氨酸的 MG53 突变体。

大鼠 MG53 S255L 正向引物: tgcagaagattctgtcagagtaccacccccag (SEQ ID NO: 79)

大鼠 MG53 S255L 反向引物: tctagccttgctgggggtgtaactctgacaga (SEQ ID NO: 80)

10 (iv) 大鼠 MG53 S255W 的正向和反向引物, 大鼠 MG53 S255W 表示大鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 3) 的第 255 位丝氨酸突变为色氨酸的 MG53 突变体。

大鼠 MG53 S255W 正向引物: tgcagaagattctgtcagagtggccacccccag (SEQ ID NO: 81)

大鼠 MG53 S255W 反向引物: tctagccttgctgggggtggccactctgacaga (SEQ ID NO: 82)

15 (v) 大鼠 MG53 S255Q 的正向和反向引物, 大鼠 MG53 S255Q 表示大鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 3) 的第 255 位丝氨酸突变为谷氨酰胺的 MG53 突变体。

大鼠 MG53 S255Q 正向引物: tgcagaagattctgtcagagcaaccacccccag (SEQ ID NO: 83)

大鼠 MG53 S255Q 反向引物: tctagccttgctgggggtggttctctgacaga (SEQ ID NO: 84)

(vi) 大鼠 MG53 S255Y 的正向和反向引物, 大鼠 MG53 S255Y 表示大鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 3) 的第 255 位丝氨酸突变为酪氨酸的 MG53 突变体。

20 大鼠 MG53 S255Y 正向引物: tgcagaagattctgtcagagtaccacccccag (SEQ ID NO: 85)

大鼠 MG53 S255Y 反向引物: tctagccttgctgggggtggatactctgacaga (SEQ ID NO: 86)

(vii) 大鼠 MG53 S255D 的正向和反向引物, 大鼠 MG53 S255D 表示大鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 3) 的第 255 位丝氨酸突变为天冬氨酸的 MG53 突变体。

大鼠 MG53 S255D 正向引物: tgcagaagattctgtcagaggatccacccccag (SEQ ID NO: 87)

25 大鼠 MG53 S255D 反向引物: tctagccttgctgggggtggatcctctgacaga (SEQ ID NO: 88)

(viii) 大鼠 MG53 S255R 的正向和反向引物, 大鼠 MG53 S255R 表示大鼠的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 3) 的第 255 位丝氨酸突变为精氨酸的 MG53 突变体。

大鼠 MG53 S255R 正向引物: tgcagaagattctgtcagagcgaccacccccag (SEQ ID NO: 89)

大鼠 MG53 S255R 反向引物: tctagccttgctgggggtggtcgctctgacaga (SEQ ID NO: 90)

5 4. 猴子 MG53 突变体的制备

按照人 MG53 S255A 突变体相同的方法制备猴子 MG53 S255A、S255G、S255L、S255W、S255Q、S255Y、S255D、S255R 突变体。除了突变引物不同之外, 其他步骤均与人 MG53 S255A 突变体的制备步骤相同。各突变体的引物如下所示:

(i) 猴子 MG53 S255A 的正向和反向引物, 猴子 MG53 S255A 表示猴子的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 4) 的第 255 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

猴子 MG53 S255A 正向引物: aagatcctggcagaggctccccacccgcccgtctg (SEQ ID NO: 91)

猴子 MG53 S255A 反向引物: cagacgggcggggtgggggagcctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 92)

(ii) 猴子 MG53 S255G 的正向和反向引物, 猴子 MG53 S255G 表示猴子的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 4) 的第 255 位丝氨酸突变为甘氨酸的 MG53 突变体。

15 猴子 MG53 S255G 正向引物: aagatcctggcagagggtccccacccgcccgtctgg (SEQ ID NO: 93)

猴子 MG53 S255G 反向引物: ccagacgggcggggtgggggaccctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 94)

(iii) 猴子 MG53 S255L 的正向和反向引物, 猴子 MG53 S255L 表示猴子的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 4) 的第 255 位丝氨酸突变为亮氨酸的 MG53 突变体。

猴子 MG53 S255L 正向引物: agatcctggcagagttacccccacccgcccgtctgga (SEQ ID NO: 95)

猴子 MG53 S255L 反向引物: tccagacgggcggggtgggggtaactctgccaggatctt (SEQ ID NO: 96)

(iv) 猴子 MG53 S255W 的正向和反向引物, 猴子 MG53 S255W 表示猴子的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 4) 的第 255 位丝氨酸突变为色氨酸的 MG53 突变体。

25 猴子 MG53 S255W 正向引物: agatcctggcagagtggccccacccgcccgtctgga (SEQ ID NO: 97)

猴子 MG53 S255W 反向引物: tccagacgggcgggtgggggccactctgccaggatct (SEQ ID NO: 98)

(v) 猴子 MG53 S255Q 的正向和反向引物, 猴子 MG53 S255Q 表示猴子的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 4) 的第 255 位丝氨酸突变为谷氨酰胺的 MG53 突变体。

5 猴子 MG53 S255Q 正向引物: aagatcctggcagagcaacccccacccgccgtctgga (SEQ ID NO: 99)

猴子 MG53 S255Q 反向引物: tccagacgggcgggtgggggtgctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 100)

(vi) 猴子 MG53 S255Y 的正向和反向引物, 猴子 MG53 S255Y 表示猴子的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 4) 的第 255 位丝氨酸突变为酪氨酸的 MG53 突变体。

猴子 MG53 S255Y 正向引物: agatcctggcagagtatccccacccgccgtctgg (SEQ ID NO: 101)

猴子 MG53 S255Y 反向引物: ccagacgggcgggtgggggatactctgccaggatct (SEQ ID NO: 102)

(vii) 猴子 MG53 S255D 的正向和反向引物, 猴子 MG53 S255D 表示猴子的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 4) 的第 255 位丝氨酸突变为天冬氨酸的 MG53 突变体。

猴子 MG53 S255D 正向引物: aagatcctggcagaggatccccacccgccgtctgg (SEQ ID NO: 103)

猴子 MG53 S255D 反向引物: ccagacgggcgggtgggggatcctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 104)

20 (viii) 猴子 MG53 S255R 的正向和反向引物, 猴子 MG53 S255R 表示猴子的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 4) 的第 255 位丝氨酸突变为精氨酸的 MG53 突变体。

猴子 MG53 S255R 正向引物: aagatcctggcagagcgtccccacccgccgtctgg (SEQ ID NO: 105)

猴子 MG53 S255R 反向引物: ccagacgggcgggtgggggacgctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 106)

5. 猪 MG53 突变体的制备

按照人 MG53 S255A 突变体相同的方法制备猪 MG53 S255A、S255G、S255L、S255W、S255Q、S255Y、S255D、S255R 突变体。除了突变引物不同之外，其他步骤均与人 MG53 S255A 突变体的制备步骤相同。各突变体的引物如下所示：

- (i) 猪 MG53 S255A 的正向和反向引物，猪 MG53 S255A 表示猪的野生型 MG53
5 (即，SEQ ID NO: 5) 的第 255 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

猪 MG53 S255A 正向引物：aagatcctggcagaggcgccccacctgccgcctg (SEQ ID NO: 107)

猪 MG53 S255A 反向引物：caggcgggcaggtggggcgccctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 108)

- (ii) 猪 MG53 S255G 的正向和反向引物，猪 MG53 S255G 表示猪的野生型 MG53
(即，SEQ ID NO: 5) 的第 255 位丝氨酸突变为甘氨酸的 MG53 突变体。

- 10 猪 MG53 S255G 正向引物：aagatcctggcagaggggccccacctgccgcctgg (SEQ ID NO: 109)

猪 MG53 S255G 反向引物：ccaggcgggcaggtgggggcccctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 110)

- (iii) 猪 MG53 S255L 的正向和反向引物，猪 MG53 S255L 表示猪的野生型 MG53
(即，SEQ ID NO: 5) 的第 255 位丝氨酸突变为亮氨酸的 MG53 突变体。

猪 MG53 S255L 正向引物：agatcctggcagagttgccccacctgccgcctgg (SEQ ID NO: 111)

- 15 猪 MG53 S255L 反向引物：ccaggcgggcaggtgggggcaactctgccaggatctt (SEQ ID NO: 112)

- (iv) 猪 MG53 S255W 的正向和反向引物，猪 MG53 S255W 表示猪的野生型 MG53
(即，SEQ ID NO: 5) 的第 255 位丝氨酸突变为色氨酸的 MG53 突变体。

猪 MG53 S255W 正向引物：agatcctggcagagtggccccacctgccgcctgg (SEQ ID NO: 113)

猪 MG53 S255W 反向引物：ccaggcgggcaggtgggggcaactctgccaggatctt (SEQ ID NO: 114)

- 20 (v) 猪 MG53 S255Q 的正向和反向引物，猪 MG53 S255Q 表示猪的野生型 MG53
(即，SEQ ID NO: 5) 的第 255 位丝氨酸突变为谷氨酰胺的 MG53 突变体。

猪 MG53 S255Q 正向引物：aagatcctggcagagcagccccacctgccgcctgg (SEQ ID NO: 115)

猪 MG53 S255Q 反向引物：ccaggcgggcaggtgggggctgctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 116)

- (vi) 猪 MG53 S255Y 的正向和反向引物，猪 MG53 S255Y 表示猪的野生型 MG53
25 (即，SEQ ID NO: 5) 的第 255 位丝氨酸突变为酪氨酸的 MG53 突变体。

猪 MG53 S255Y 正向引物：agatcctggcagagtatccccacctgccgcctgga (SEQ ID NO: 117)

猪 MG53 S255Y 反向引物: tccaggcgggcaggtgggggatactctgccaggatct (SEQ ID NO: 118)

(vii) 猪 MG53 S255D 的正向和反向引物, 猪 MG53 S255D 表示猪的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 5) 的第 255 位丝氨酸突变为天冬氨酸的 MG53 突变体。

猪 MG53 S255D 正向引物: aagatcctggcagaggatccccacctgccgcctgga (SEQ ID NO: 119)

猪 MG53 S255D 反向引物: tccaggcgggcaggtgggggatactctgccaggatctt (SEQ ID NO: 120)

(viii) 猪 MG53 S255R 的正向和反向引物, 猪 MG53 S255R 表示猪的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 5) 的第 255 位丝氨酸突变为精氨酸的 MG53 突变体。

猪 MG53 S255R 正向引物: aagatcctggcagagcggccccacctgccgcctgg (SEQ ID NO: 121)

猪 MG53 S255R 反向引物: ccaggcgggcaggtgggggccgctctgccaggatctt (SEQ ID NO: 122)

6. 狗 MG53 突变体的制备

按照人 MG53 S255A 突变体相同的方法制备狗 MG53 S255A、S255G、S255L、S255W、S255Q、S255Y、S255D、S255R 突变体。除了突变引物不同之外, 其他步骤均与人 MG53 S255A 突变体的制备步骤相同。各突变体的引物如下所示:

(i) 狗 MG53 S255A 的正向和反向引物, 狗 MG53 S255A 表示狗的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 6) 的第 255 位丝氨酸突变为丙氨酸的 MG53 突变体。

狗 MG53 S255A 正向引物: aagatcctggcagaagcaccaccgcctgcccgtttg (SEQ ID NO: 123)

狗 MG53 S255A 反向引物: caaacgggcaggcgggtggtccttctgccaggatctt (SEQ ID NO: 124)

(ii) 狗 MG53 S255G 的正向和反向引物, 狗 MG53 S255G 表示狗的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 6) 的第 255 位丝氨酸突变为甘氨酸的 MG53 突变体。

狗 MG53 S255G 正向引物: aagatcctggcagaaggaccaccgcctgcccgtttg (SEQ ID NO: 125)

狗 MG53 S255G 反向引物: ccaaacgggcaggcgggtggtccttctgccaggatctt (SEQ ID NO: 126)

(iii) 狗 MG53 S255L 的正向和反向引物, 狗 MG53 S255L 表示狗的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 6) 的第 255 位丝氨酸突变为亮氨酸的 MG53 突变体。

狗 MG53 S255L 正向引物: agatcctggcagaattaccaccgcctgcccgtttg (SEQ ID NO: 127)

狗 MG53 S255L 反向引物: ccaaacgggcaggcgggtggtattctgccaggatct (SEQ ID NO: 128)

(iv)狗 MG53 S255W 的正向和反向引物,狗 MG53 S255W 表示狗的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 6) 的第 255 位丝氨酸突变为色氨酸的 MG53 突变体。

狗 MG53 S255W 正向引物: agatcctggcagaatggccaccgcctgccggttga (SEQ ID NO: 129)

狗 MG53 S255W 反向引物: tccaaacgggcaggcggtggccattctgccaggatct (SEQ ID NO: 130)

5 (v)狗 MG53 S255Q 的正向和反向引物,狗 MG53 S255Q 表示狗的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 6) 的第 255 位丝氨酸突变为谷氨酰胺的 MG53 突变体。

狗 MG53 S255Q 正向引物: aagatcctggcagaacaaccaccgcctgccggttga (SEQ ID NO: 131)

狗 MG53 S255Q 反向引物: ccaaacgggcaggcggtggtgttctgccaggatctt (SEQ ID NO: 132)

10 (vi)狗 MG53 S255Y 的正向和反向引物,狗 MG53 S255Y 表示狗的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 6) 的第 255 位丝氨酸突变为酪氨酸的 MG53 突变体。

狗 MG53 S255Y 正向引物: agatcctggcagaatatccaccgcctgccggttga (SEQ ID NO: 133)

狗 MG53 S255Y 反向引物: tccaaacgggcaggcggtgatattctgccaggatct (SEQ ID NO: 134)

(vii)狗 MG53 S255D 的正向和反向引物,狗 MG53 S255D 表示狗的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 6) 的第 255 位丝氨酸突变为天冬氨酸的 MG53 突变体。

15 狗 MG53 S255D 正向引物: aagatcctggcagaagatccaccgcctgccggttga (SEQ ID NO: 135)

狗 MG53 S255D 反向引物: tccaaacgggcaggcggtggatcttctgccaggatctt (SEQ ID NO: 136)

(viii)狗 MG53 S255R 的正向和反向引物,狗 MG53 S255R 表示狗的野生型 MG53 (即, SEQ ID NO: 6) 的第 255 位丝氨酸突变为精氨酸的 MG53 突变体。

狗 MG53 S255R 正向引物: aagatcctggcagaacgaccaccgcctgccggttga (SEQ ID NO: 137)

20 狗 MG53 S255R 反向引物: ccaaacgggcaggcggtggtctgttctgccaggatctt (SEQ ID NO: 138)

可以按照人 MG53 S255A 突变体相同的方法制备其他物种 MG53 各位点丝氨酸缺失和/或突变的突变体。除了突变引物不同之外,其他步骤均与人 MG53 S255A 突变体的制备步骤相同。本领域技术人员可以使用本领域常规技术手段设计各突变体的引物。

实施例 2: 小鼠 MG53 S255A 突变体对小鼠野生型 MG53 的细胞修复功能和心脏
25 **保护功能的影响**

为了验证小鼠 MG53 S255A 突变体(其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示)对小鼠

野生型 MG53 的细胞修复功能和心脏保护功能的影响，发明人在大鼠的原代培养的乳鼠心肌细胞（NRVM）中使用腺病毒过表达小鼠野生型 MG53 及小鼠 MG53 S255A 突变体，检测细胞的存活状况。结果如图 14 所示，模拟缺血再灌注损伤的缺氧复氧引起 NRVM 的乳酸脱氢酶（LDH）的大量释放和细胞内 ATP 的降低；过表达小鼠野生型 MG53 及小鼠 MG53 S255A 突变体能差不多同等程度地抑制 LDH 的释放和 ATP 的降低。这说明小鼠野生型 MG53 对缺血再灌注引起的细胞凋亡和坏死等损伤的具有保护作用，而小鼠 MG53 S255A 突变体并不影响小鼠野生型 MG53 的细胞修复功能和心脏保护功能，即小鼠 MG53 S255 位点的磷酸化不调控 MG53 的细胞修复功能和心脏保护功能。

10 小鼠 MG53 S255A 突变不影响 MG53 对 RISK 信号通路的激活

MG53 的心脏保护功能的机制是：它是心脏保护的 RISK 信号通路中的重要分子，能介导小窝蛋白 caveolin-3 和 p85-PI3K 蛋白相互作用，从而激活 RISK 信号通路，如下游重要的信号分子 AKT（参见 Zhang Y. et al, *Cardiovascular research* 91, 108-115 (2011)）。所以，进一步地，发明人检测小鼠 MG53 S255A 突变不影响 MG53 心脏保护的机制是否是小鼠 MG53 S255A 突变体和小鼠野生型 MG53 同等程度地激活 RISK 信号通路。实验结果如图 15 所示，在 NRVM 中过表达小鼠野生型 MG53 能提高 RISK 信号通路的下游信号分子 AKT 的 473 位丝氨酸的磷酸化，即能激活 AKT；而小鼠 MG53 S255A 突变体与小鼠野生型 MG53 同等程度地提高 AKT 的 473 位丝氨酸的磷酸化，即激活 AKT。说明小鼠 MG53 S255A 突变体不影响小鼠野生型 MG53 对 RISK 信号通路的激活，即，小鼠 MG53 S255 的磷酸化调控不影响心脏保护的 RISK 信号通路。

实施例 3：人或小鼠 MG53 S255A 突变体对野生型 MG53 的 E3 泛素连接酶活性的影响

MG53 高表达引起的胰岛素信号通路的阻遏是胰岛素抵抗和代谢综合症发生发展的重要机制之一，也是 MG53 的重要功能之一。首先，发明人构建了小鼠野生型 MG53 的丝氨酸突变的表达质粒—小鼠 MG53 S255A（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示）。另外，发明人还构建了 IRS1 的表达质粒、泛素的表达质粒、小鼠野生型 MG53 的表达质粒。其次，发明人之前的研究表明，MG53 是胰岛素底物 IRS1 的 E3 泛素连接酶，可以介导其蛋白质的蛋白酶体途径降解（Song, R. et al. *Nature* 494, 375-379, (2013)）。所以发明人将 IRS1 的表达质粒、泛素的表达质粒、与小鼠野生型 MG53 或小鼠 MG53

S255A 突变体的质粒共转染入 HEK293T 细胞系内，通过 IRS1 蛋白含量的变化来反应小鼠 MG53 S255A 突变对 MG53 功能的影响。实验结果如图 19 所示，结果表明，小鼠野生型 MG53 可以极大程度上降低 IRS1 的表达量；而小鼠 MG53 S255A 突变体能够显著地抑制 MG53 介导的 IRS1 的蛋白量降低。说明在 HEK293T 细胞系的共表达体系中，小鼠野生型 MG53 可以发挥正常的 E3 泛素连接酶功能，介导 IRS1 的泛素化降解；检测到的小鼠 MG53 S255A 突变体抑制了 MG53 的 E3 泛素连接酶功能，即 MG53 的 S255 位点的磷酸化状态能调控 MG53 的 E3 泛素连接酶功能。

人或小鼠 MG53 S255A 突变体抑制 MG53 介导的底物降解

MG53 是 RING 结构域型 E3 泛素连接酶，MG53 的 RING 结构域与 E2 泛素交联酶相结合介导底物的泛素化和进一步的蛋白酶降解。所以 RING 结构域切除的截短体 MG53-D-RING 就丧失了野生型 MG53 的 E3 泛素连接酶功能。进一步地，为了定量地衡量人 MG53 S255A 突变体（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示）或小鼠 MG53 S255A 突变体（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示）对人或小鼠野生型 MG53 的 E3 泛素连接酶功能的影响，发明人以人或小鼠 MG53-D-RING 为阳性对照，在人胚肾上皮细胞系 HEK293T 中共表达人或小鼠野生型 MG53、MG53 S255A 突变体、或 MG53-D-RING 截短体和 MG53 的底物 IRS1 或胰岛素受体 IR，检测不同的突变对 MG53 介导的底物的降解的影响。结果如图 16（小鼠）和图 17（人）所示，人或小鼠野生型 MG53 可以极大程度地介导 IRS1 的降解；人或小鼠 MG53-D-RING 截短体几乎完全不能介导 IRS1 的降解；而小鼠 MG53 S255A 突变体只能介导 IRS1 约 40% 的降解，人 MG53 S255A 突变体只能介导 IRS1 约 10% 的降解。小鼠野生型 MG53 可以介导约 50% 的 IR β 的降解；小鼠 MG53-D-RING 截短体和小鼠 MG53 S255A 突变体几乎完全不能介导 IR β 的降解。另外，在 HEK293T 的共表达系统中，小鼠野生型 MG53 可以介导 IR β 蛋白的前体蛋白的降解，同时小鼠 MG53-D-RING 截短体和小鼠 MG53 S255A 突变体几乎完全抑制这种 MG53 介导的降解作用。本实验说明，人或小鼠 MG53-D-RING 截短体极显著地抑制了 MG53 的 E3 泛素连接酶功能；而人或小鼠 MG53 S255A 突变体大约能抑制 MG53 50% 以上的 E3 泛素连接酶功能。

小鼠 MG53 S255A 突变体抑制 MG53 与底物 IRS1 蛋白的结合

为了检测小鼠 MG53 S255A 突变体（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示）是否影响 MG53 与底物 IRS1 蛋白的识别和结合，发明人一方面在离体的 HEK293T 细胞系中

通过免疫共沉淀检测活性状态下底物 IRS1 与小鼠野生型 MG53 或小鼠 MG53 S255A 突变体的结合能力；另一方面通过表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR) 实验检测纯化的蛋白 IRS1 和小鼠野生型 MG53 或小鼠 MG53 S255A 突变体的直接结合能力。实验结果如图 18 所示，图 18A 显示 IRS1 可以和小鼠野生型 MG53 进行物理性结合；而同样量的 IRS1 只能结合极少量的小鼠 MG53 S255A 突变体；图 18B 显示小鼠野生型 MG53 蛋白可以与 IRS1 蛋白很好的结合， $KD=64.2nM$ ；而小鼠 MG53 S255A 突变体蛋白不能和 IRS1 蛋白结合。由此可见，小鼠 MG53 S255A 突变体抑制了 MG53 对底物 IRS1 蛋白的识别和结合，从而抑制了 MG53 的 E3 泛素连接酶活性。

实施例 4：人 MG53 S255A 突变体的体内活性

10 为了验证人 MG53 S255A 突变体（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示）在体内是否仍然具有细胞修复功能和心脏保护功能，并且同时避免或减少了野生型 MG53 所带来的代谢类副作用，发明人通过将人 MG53 S255A 突变体和人野生型 MG53 分别引入大鼠体内，进一步分析人 MG53 S255A 突变体的体内活性。首先，发明人根据实施例 1 制备人 MG53 S255A 突变体。其次，选择 15 只雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠（每只约 250g，由北京维通利华实验动物有限公司提供），分成三组，实验组、阳性对照组、阴性对照组，每组分别 5 只。30mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠之后，在左侧第三肋间开胸，暴露出心脏。然后，向实验组大鼠心脏静脉注射人 MG53 S255A 突变体蛋白（6mg/kg，iv），向阳性对照组大鼠心脏静脉注射人野生型 MG53 蛋白（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示）（6mg/kg，iv），向阴性对照组大鼠心脏静脉注射牛血清白蛋白（BSA）（6mg/kg，iv）。各组大鼠分别在静脉注射上述蛋白 5 分钟后结扎心脏冠状动脉左前降支，并持续 45 分钟。结扎结束之前，各组大鼠再次静脉注射相应的人 MG53 S255A 突变体蛋白、人野生型 MG53 蛋白以及 BSA（6mg/kg，iv），然后松开冠状动脉。再灌注 24 小时之后，24 小时内未死亡的大鼠定义为存活，死亡定义为死亡，以此结果比较实验组、阳性对照组和阴性对照组大鼠的生存率。使用胰岛素刺激各组大鼠，随后处死大鼠，比较实验组、阳性对照组和阴性对照组大鼠的心肌梗塞面积、血清 LDH 浓度以及心脏病理切片 TUNEL 染色情况，进行各组大鼠心脏损伤评价。实验组大鼠的心肌梗塞面积显著性地小于阴性对照组大鼠的心肌梗塞面积，或者实验组大鼠与阴性对照组大鼠相比能够显著性地抑制 LDH 释放，或者实验组大鼠的心脏病理切片 TUNEL 染色结果显著性地优于阴性对照组大鼠的心脏病理切片 TUNEL

- 染色结果，则表明人 MG53 S255A 突变体并不影响人野生型 MG53 的细胞修复功能和心脏保护功能，能够用于治疗心脏疾病，例如心肌梗塞、心脏缺血/再灌注损伤等。最后比较实验组、阳性对照组和阴性对照组大鼠各组织（例如，心肌、骨骼肌、肝脏）里 p-AKT/t-AKT 的变化情况，从而评价实验组、阳性对照组和阴性对照组大鼠各组织的胰岛素反应性。阳性对照组大鼠的组织里 p-AKT/t-AKT 比值下降，表明人野生型 MG53 蛋白引起胰岛素敏感性下降；阴性对照组大鼠的组织里 p-AKT/t-AKT 比值正常，表明 BSA 对胰岛素敏感性无影响；实验组大鼠的组织里 p-AKT/t-AKT 比值比阳性对照组高，表明人 MG53 S255A 突变体可以消除或减弱人野生型 MG53 蛋白引起的胰岛素敏感性下降。
- 10 综上所述，MG53 coiled-coil-SPRY 结构域内的至少一个丝氨酸（特别是第 255 位丝氨酸）缺失或突变为任何其他非丝氨酸或苏氨酸（例如，丙氨酸）的氨基酸时，产生的 MG53 突变体在具有细胞修复功能和/或心脏保护功能的同时，又避免或减少了胰岛素抵抗等代谢类副作用。

- 15 虽然本发明通过引用特定实施例的方式对发明进行特定的展现和描述，但是本领域技术人员都应该理解，在不脱离本发明披露的主旨和保护范围的情况下，上述内容还可以进行各种形式和细节上的变化。