

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-539141
(P2024-539141A)

(43)公表日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	4 C 0 8 4	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	4 C 0 8 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	4 H 0 4 5
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全130頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-523627(P2024-523627)		(71)出願人	516008350	
(86)(22)出願日	令和4年10月21日(2022.10.21)			アネクソン, インコーポレーテッド	
(85)翻訳文提出日	令和6年4月26日(2024.4.26)			アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォル	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/078510			ニア州, ブリスベン, ビルディング シ	
(87)国際公開番号	WO2023/070087			ー, セカンド フロア シエラ ポイント	
(87)国際公開日	令和5年4月27日(2023.4.27)			パークウェイ 1 4 0 0	
(31)優先権主張番号	63/270,352		(71)出願人	519295812	
(32)優先日	令和3年10月21日(2021.10.21)			ウニヴェルシタ デリ ストゥディ ディ	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			トレント	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			イタリア国 3 8 1 2 2 トレント, ヴィ	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		(71)出願人	511262290	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			フォンダツィオーネ テレトン イーティ	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			ーエス	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			イタリア国 0 0 1 8 5 ローマ, ヴィア	
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 筋ジストロフィーを治療するための組成物及び方法

(57)【要約】

本開示は、広義には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー（L GMD）、V I型コラーゲン関連障害、先天性筋ジストロフィー（CMD）及び先天性ミオパチー、遠位型筋ジストロフィー／ミオパチーの予防、発症リスクの低減、または治療方法に関する。該方法は、対象に、C 1複合体阻害剤、C 1複合体阻害剤、C 1 q阻害剤、C 1 s阻害剤、またはC 1 r阻害剤等の古典的補体経路の阻害剤を投与することを含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）、VI型コラーゲン関連障害、先天性筋ジストロフィー（CMD）もしくは先天性ミオパチー、または遠位型筋ジストロフィー／ミオパチーの予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法であって、古典的補体経路の阻害剤を対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）が、サルコグリカノパチー、ジストログリカノパチー、またはジスフェリノパチーである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記 VI 型コラーゲン関連障害が、ベスレム型ミオパチーまたはウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー（UCMD）である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記遠位型筋ジストロフィー／ミオパチーが、三好型ミオパチーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記古典的補体経路の前記阻害剤が、C1 複合体阻害剤である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 C1 複合体阻害剤が、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエビジェネティック編集剤である、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記核酸が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA 阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体が、抗 C1 複合体抗体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗 C1 複合体抗体が、C1r もしくは C1s の活性化を阻害するか、または C2 もしくは C4 に作用するそれらの能力を妨げる、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記抗 C1 複合体抗体が、C1 複体内の組み合わせエピトープに結合し、前記組み合わせエピトープが、C1q 及び C1s の両方、C1q 及び C1r の両方、C1r 及び C1s の両方、または C1q、C1r 及び C1s のそれぞれのアミノ酸を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記古典的補体経路の前記阻害剤が、C1q 阻害剤である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 C1q 阻害剤が、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエビジェネティック編集剤である、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記核酸が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA 阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記抗体が、抗 C1q 抗体である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記抗 C1q 抗体が、C1q と自己抗体との間または C1q と C1r との間、または C1q と C1s との間の相互作用を阻害する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

50

前記抗 C 1 q 抗体が、循環または組織からの C 1 q のクリアランスを促進する、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記抗 C 1 q 抗体が、1 0 0 n M ~ 0 . 0 0 5 n M または 0 . 0 0 5 n M 未満の範囲の解離定数 (K _D) を有する、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記抗 C 1 q 抗体が、2 0 : 1 ~ 1 . 0 : 1 または 1 . 0 : 1 未満の範囲の結合化学量論で C 1 q に結合する、請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記抗体が、6 : 1 ~ 1 . 0 : 1 または 1 . 0 : 1 未満の範囲の結合化学量論で C 1 q に結合する抗 C 1 q 抗体である、請求項 1 8 に記載の方法。 10

【請求項 2 0】

前記抗体が、2 . 5 : 1 ~ 1 . 0 : 1 または 1 . 0 : 1 未満の範囲の結合化学量論で C 1 q に結合する抗 C 1 q 抗体である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記抗体が、C 1 q に特異的に結合し、かつその生物学的活性を中和する、請求項 1 4 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記生物学的活性が、(1) 自己抗体に対する C 1 q 結合、(2) C 1 r に対する C 1 q 結合、(3) C 1 s に対する C 1 q 結合、(4) I g M に対する C 1 q 結合、(5) ホスファチジルセリンに対する C 1 q 結合、(6) ペントラキシン-3 に対する C 1 q 結合、(7) C 反応性タンパク質 (C R P) に対する C 1 q 結合、(8) 球状 C 1 q 受容体 (g C 1 q R) に対する C 1 q 結合、(9) 補体受容体 1 (C R 1) に対する C 1 q 結合、(1 0) ベーターアミロイドに対する C 1 q 結合、(1 1) カルレチキュリンに対する C 1 q 結合、(1 2) アポトーシス細胞に対する C 1 q 結合、または (1 3) B 細胞に対する C 1 q 結合である、請求項 2 1 に記載の方法。 20

【請求項 2 3】

前記生物学的活性が、(1) 古典的補体活性化経路の活性化、(2) 抗体及び補体依存性細胞傷害の活性化、(3) C H 5 0 溶血、(4) シナプス損失、(5) B 細胞抗体産生、(6) 樹状細胞成熟、(7) T 細胞増殖、(8) サイトカイン産生、(9) ミクログリア活性化、(1 0) 免疫複合体形成、(1 1) シナプスもしくは神経終末の食作用、(1 2) 補体受容体 3 (C R 3 / C 3) 発現細胞の活性化、または (1 3) 神経炎症である、請求項 2 1 または 2 2 に記載の抗体。 30

【請求項 2 4】

前記 C H 5 0 溶血が、ヒト C H 5 0 溶血を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記抗体が、前記ヒト C H 5 0 溶血の少なくとも約 5 0 % ~ 約 1 0 0 % を中和することが可能である、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記抗体が、1 5 0 n g / m l 未満、1 0 0 n g / m l 未満、5 0 n g / m l 未満、または 2 0 n g / m l 未満の用量で、前記 C H 5 0 溶血の少なくとも 5 0 % を中和することが可能である、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 2 7】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、一価抗体、多重特異性抗体、抗体断片、またはその抗体誘導体である、請求項 1 4 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記抗体が、抗体断片であり、前記抗体断片が、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ') 2 断片、F v 断片、ダイアボディ、または一本鎖抗体分子である、請求項 2 7 に記載の方法。 50

【請求項 29】

前記抗体が、配列番号5のアミノ酸配列を有するHVR-L1と、配列番号6のアミノ酸を有するHVR-L2と、配列番号7のアミノ酸を有するHVR-L3と、を含む軽鎖可変ドメインを含む、請求項14～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 30】

前記抗体が、配列番号9のアミノ酸配列を有するHVR-H1と、配列番号10のアミノ酸を有するHVR-H2と、配列番号11のアミノ酸を有するHVR-H3と、を含む重鎖可変ドメインを含む、請求項14～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 31】

前記抗体が、配列番号4及び35～38から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、前記軽鎖可変ドメインが、配列番号5のアミノ酸配列を有するHVR-L1と、配列番号6のアミノ酸を有するHVR-L2と、配列番号7のアミノ酸を有するHVR-L3と、を含む、請求項14～30のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 32】

前記軽鎖可変ドメインが、配列番号4及び35～38から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

前記抗体が、配列番号8及び31～34から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、前記重鎖可変ドメインが、配列番号9のアミノ酸配列を有するHVR-H1と、配列番号10のアミノ酸を有するHVR-H2と、配列番号11のアミノ酸を有するHVR-H3と、を含む、請求項14～32のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 34】

前記重鎖可変ドメインが、配列番号8及び31～34から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

前記抗体が、配列番号39の重鎖Fab断片及び配列番号40の軽鎖Fab断片を含む抗体断片である、請求項14～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 36】

前記古典的補体経路の前記阻害剤が、C1r阻害剤である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 37】

前記C1r阻害剤が、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエピジェネティック編集剤である、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

前記核酸が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸である、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

前記抗体が、抗C1r抗体である、請求項37に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記抗C1r抗体が、C1rとC1qとの間もしくはC1rとC1sとの間の相互作用を阻害するか、または前記抗C1r抗体が、C1rの触媒活性を阻害するか、もしくはpro-C1rの活性プロテアーゼへの処理を阻害する、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

前記抗体が、100nM～0.005nMまたは0.005nM未満の範囲の解離定数(K_D)を有する抗C1r抗体である、請求項39または40に記載の方法。

【請求項 42】

前記抗体が、20:1～1.0:1または1.0:1未満の範囲の結合化学量論でC1rに結合する抗C1r抗体である、請求項39～41のいずれか1項に記載の方法。

50

【請求項 43】

前記抗体が、 $6:1 \sim 1.0:1$ または $1.0:1$ 未満の範囲の結合化学量論で C1r に結合する抗 C1r 抗体である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記抗体が、 $2.5:1 \sim 1.0:1$ または $1.0:1$ 未満の範囲の結合化学量論で C1r に結合する抗 C1r 抗体である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記抗 C1r 抗体が、循環または組織からの C1r のクリアランスを促進する、請求項 39～44 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 46】

前記古典的補体経路の前記阻害剤が、C1s 阻害剤である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

前記 C1s 阻害剤が、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエビジェネティック編集剤である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記核酸が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA 阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記抗体が、抗 C1s 抗体である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

前記抗 C1s 抗体が、C1s と C1q との間または C1s と C1r との間または C1s と C2 もしくは C4 との間の相互作用を阻害するか、あるいは前記抗 C1s 抗体が、C1s の触媒活性を阻害するか、または pro-C1s の活性プロテアーゼへの処理を阻害するか、または C1s の活性化形態に結合する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記抗体が、 $100\text{ nM} \sim 0.005\text{ nM}$ または 0.005 nM 未満の範囲の解離定数 (K_D) を有する抗 C1s 抗体である、請求項 49 または 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記抗体が、 $20:1 \sim 1.0:1$ または $1.0:1$ 未満の範囲の結合化学量論で C1s に結合する抗 C1s 抗体である、請求項 49～51 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 53】

前記抗体が、 $6:1 \sim 1.0:1$ または $1.0:1$ 未満の範囲の結合化学量論で C1s に結合する抗 C1s 抗体である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記抗体が、 $2.5:1 \sim 1.0:1$ または $1.0:1$ 未満の範囲の結合化学量論で C1s に結合する抗 C1s 抗体である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記抗 C1s 抗体が、循環または組織からの C1s のクリアランスを促進する、請求項 49～54 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 56】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法であって、古典的補体経路の阻害剤を対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 57】

対象に、C1q 阻害抗体を投与することを含む、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD)、VI 型コラーゲン関連障害、先天性筋ジストロフィー (CMD) もしくは先天性ミオパチー、または遠位型筋ジストロフィー／ミオパチーの予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法であって、前記抗体が、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する HVR-L1

10

20

30

40

50

と、配列番号6のアミノ酸を有するHVR-L2と、配列番号7のアミノ酸を有するHVR-L3と、を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号9のアミノ酸配列を有するHVR-H1と、配列番号10のアミノ酸を有するHVR-H2と、配列番号11のアミノ酸を有するHVR-H3と、を含む重鎖可変ドメインと、を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本特許出願は、2021年10月21日に出願された米国仮特許出願第63/270,352号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0002】

筋ジストロフィーは、経時的に筋肉を弱くし、柔軟性を低下させる一連の疾患である。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）が最も一般的なタイプである。それは、身体が筋肉を健康に保つのを制御する遺伝子の欠陥によって引き起こされる。

【0003】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、小児の最も一般的な遺伝性筋肉疾患である。通常の条件下では、筋幹細胞（衛星細胞）は非常に強力な再生応答を呈するが、DMDに罹患した患者では再生ポテンシャルが徐々に失われ、線維化組織が筋線維を徐々に置き換え、筋肉機能の障害を引き起こす。

20

【0004】

筋ジストロフィーに対処しようとしている世界中の研究者や医療専門家の努力にもかかわらず、またゲノムエンジニアリングアプローチによる可能性にもかかわらず、筋ジストロフィーのための安全で効果的な治療法を開発するための深刻な必要性が依然存在する。すなわち、筋ジストロフィーを予防し、発症リスクを低減し、治療するための新たな療法が必要とされている。

【0005】

筋ジストロフィーには、進行性の筋肉の消耗及び衰弱を特徴とする、遺伝性障害の不均一な群が含まれる。筋ジストロフィーでは、筋肉機能障害は、サルコレンマ、細胞外マトリックス、核膜、及び肉腫器官に関連するタンパク質を含む、異なる細胞成分をコードする遺伝子の突然変異から生じる。異なる形態のジストロフィーは、発症年齢、症候性進行の重症度、及び罹患した筋肉の分布の点で異なる。

30

【0006】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD、OMIM310200）は、5,000人の男性新生児のうち約1人の発生率を有する、最も頻度が高く、最も重篤な形態の筋ジストロフィーの1つである。DMD患者は、通常、小児期に四肢筋、幹筋、及び横隔膜の進行性の衰弱を呈し、最終的に消耗、脊柱後弯症、及び重度の呼吸器疾患につながる。ベッカー筋ジストロフィー（BMD、OMIM300376）は、より稀な（20,000人の男性新生児のうち約1人）かつ臨床的に軽度の形態のジストロフィーであり、DMDと同じ原因対立遺伝子を有する。DMD及びBMDは、ジストロフィンをコードするDMD遺伝子の突然変異によって引き起こされる。

40

【0007】

ジストロフィン糖タンパク質複合体（DGC）と呼ばれる形質膜関連複合体の成分であり、細胞内細胞骨格を周囲の細胞外マトリックスに接続するためのフレームワークとして機能する。適切な筋肉機能及び完全性に対するDGCの重要な役割は、DMD/BMDとDGCの他の構成要素をコードする遺伝子の突然変異によって引き起こされるいくつかのジストロフィー、すなわち、四肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）（サルコグリカノパチー、ジストログリカノパチー及びデスフェリンパチーを含む）、V型コラーゲン関連障害（ベスレム型ミオパチー及びウルリッヒ先天性筋ジストロフィー（UCMD）を含む）、先天性筋ジストロフィー（CMD）及び先天性ミオパチー、遠位

50

型筋ジストロフィー／ミオパチー（三好型ミオパチーを含む）、との間の病理学的特徴の重複によって実証される。

【0008】

筋緊張性筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕部筋ジストロフィー、エメリーードライフス筋ジストロフィー、眼球咽頭筋ジストロフィーは、DGCの変化に起因しない分子病因を有するようであり、これは特定の病理学的側面によって反映される。特に、筋緊張性ジストロフィー（DM）は、最も一般的な成人の筋ジストロフィーであり、常染色体優性進行性ミオパチー、筋緊張及び多臓器関与を特徴とする。これまでに、次の2つの異なる形式、すなわち、DMPKにおける（CTG）_nの拡大によって引き起こされる筋緊張性ジストロフィー1型（DM1、スタインルト病）、及びZNF9／CNBPにおける（CCTG）_nの拡大によって引き起こされる筋緊張性ジストロフィー2型（DM2）、が特定されている。突然変異転写産物は、RNA結合タンパク質を隔離する核病巣として凝集し、下流エフェクター遺伝子のスプライスオパチーをもたらす。

10

【発明の概要】

【0009】

本開示は、広義には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、四肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）（サルコグリカノパチー、ジストログリカノパチー及びジスフェルリン病など）、VI型コラーゲン関連障害（ベスレム型ミオパチー及びウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー（UCMD）など）、先天性筋ジストロフィー（CMD）及び先天性ミオパチー、ならびに遠位型筋ジストロフィー／ミオパチー（三好型ミオパチーなど）の予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法に関する。該方法は、対象に、C1複合体阻害剤、C1q阻害剤、C1s阻害剤、またはC1r阻害剤等の古典的補体経路の阻害剤を投与することを含み得る。いくつかの態様では、本明細書中で提供されるのは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法である。該方法は、古典的補体経路の阻害剤を対象に投与することを含み得る。

20

【0010】

いくつかの実施形態では、古典的補体経路の阻害剤は、C1複合体阻害剤、例えば、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエピジェネティック編集剤である。核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸であり得る。抗体は、抗C1複合体抗体であり得、それは好ましくはC1rもしくはC1s活性化を阻害するか、またはC2もしくはC4に作用するそれらの能力を妨げ、及び／またはC1複合体内の組み合わせエピトープに結合し、当該組み合わせエピトープは、C1q及びC1sの両方、C1q及びC1rの両方、C1r及びC1sの両方、またはC1q、C1r及びC1sのそれぞれのアミノ酸を含む。

30

【0011】

いくつかの実施形態では、古典的補体経路の阻害剤は、C1q阻害剤であり、例えば、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエピジェネティック編集剤である。核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸であり得る。抗体は、抗C1q抗体であり得、それは好ましくはC1qと自己抗体との間、またはC1qとC1rとの間、またはC1qとC1sとの間の相互作用を阻害し、及び／または循環もしくは組織からのC1qのクリアランスを促進する。いくつかの実施形態では、抗C1q抗体は、100nM～0.005nMまたは0.005nM未満の範囲の解離定数（KD）を有し、20:1～1.0:1または1.0:1未満の範囲の結合化学量論でC1qに結合し、及び／または、6:1～1.0:1もしくは1.0:1未満の範囲の結合化学量論でC1qに結合し、2.5:1～1.0:1もしくは1.0:1未満の範囲の結合化学量論でC1qに結合する。いくつかの実施形態では、抗C1q抗体は、（1）自己抗体に対するC1q結合、（2）C1rに対するC1q結合、（3）C1sに対するC1q結合、（4

40

50

）IgMに対するC1q結合、（5）ホスファチジルセリンに対するC1q結合、（6）ペントラキシン-3に対するC1q結合、（7）C反応性タンパク質（CRP）に対するC1q結合、（8）球状C1q受容体（gC1qR）に対するC1q結合、（9）補体受容体1（CR1）に対するC1q結合、（10）ベーターアミロイドに対するC1q結合、（11）カルレチキュリンに対するC1q結合、（12）アポトーシス細胞に対するC1q結合、もしくは（13）B細胞に対するC1q結合、及び／または、（1）古典的補体活性化経路の活性化、（2）抗体及び補体依存的細胞毒性の活性化、（3）CH50溶血、（4）シナプス損失、（5）B細胞抗体産生、（6）樹状細胞成熟、（7）T細胞増殖、（8）サイトカイン産生（9）ミクログリア活性化、（10）免疫複合体形成、（11）シナプスまたは神経末端のファゴサイトーシス、（12）補体受容体3（CR3／C3）発現細胞の活性化または（13）神経炎症など、C1qの生物学的活性に特異的に結合し、中和する。CH50溶血は、ヒトCH50溶血を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトCH50溶血の少なくとも約50％から約100％まで中和することができ、及び／または、抗体は、CH50溶血の少なくとも50％を、150ng／ml未満、100ng／ml未満、50ng／ml未満または20ng／ml未満の用量で中和することができる。抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、一価抗体、多重特異性抗体、抗体断片、またはそれらの抗体誘導体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体断片であり、抗体断片は、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fv断片、ダイアボディ、または一本鎖抗体分子である。

10

20

【0012】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を有するHVR-L1と、配列番号6のアミノ酸を有するHVR-L2と、配列番号7のアミノ酸を有するHVR-L3とを含む軽鎖可変ドメインと、及び／または配列番号9のアミノ酸配列を有するHVR-H1と、配列番号10のアミノ酸を有するHVR-H2と、配列番号11のアミノ酸を有するHVR-H3とを含む重鎖可変ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号4及び35～38から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約95％の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号5のアミノ酸配列を有するHVR-L1と、配列番号6のアミノ酸を有するHVR-L2と、配列番号7のアミノ酸を有するHVR-L3と、を含み、好ましくは軽鎖可変ドメインは、配列番号4及び35～38から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号8及び31～34から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約95％の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインは、配列番号9のアミノ酸配列を有するHVR-H1と、配列番号10のアミノ酸を有するHVR-H2と、配列番号11のアミノ酸を有するHVR-H3と、を含み、好ましくは重鎖可変ドメインは、配列番号8及び31～34から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号39の重鎖Fab断片及び配列番号40の軽鎖Fab断片を含む抗体断片である。

30

【0013】

いくつかの実施形態では、古典的補体経路の阻害剤は、C1r阻害剤であり、例えば、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエプジェネティック編集剤である。核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸である。いくつかの実施形態では、抗体は抗C1r抗体であり、それは好ましくはC1rとC1qとの間もしくはC1rとC1sとの間の相互作用を阻害するか、または抗C1r抗体は、C1rの触媒活性を阻害するか、もしくはpro-C1rの活性プロテアーゼへの処理を阻害する。いくつかの実施形態では、抗体は、100nM～0.005nMまたは0.005nM未満の範囲の解離定数（KD）を有する抗C1r抗体であり、抗C1r抗体は、20：1～1.0：1または1.0：1未満の範囲の結合化学量論でC1rに結合し、抗C1r抗体は、6：1～1.0：1もしくは1.0：1未満の範囲の結合化学量論でC1rに結合し、

40

50

及び／または、抗C1r抗体は、2.5:1~1.0:1もしくは1.0:1未満の範囲の結合化学量論でC1rに結合する。いくつかの実施形態では、抗C1r抗体は、循環または組織からのC1rのクリアランスを促進する。

【0014】

いくつかの実施形態では、古典的補体経路の阻害剤は、C1s阻害剤であり、例えば、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエプジェネティック編集剤である。核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は抗C1s抗体であり、それは好ましくはC1sとC1qとの間またはC1sとC1rとの間またはC1sとC2もしくはC4との間の相互作用を阻害するか、あるいは、抗C1s抗体は、C1sの触媒活性を阻害するか、またはpro-C1sの活性プロテアーゼへの処理を阻害するか、またはC1sの活性化形態に結合する。いくつかの実施形態では、抗C1s抗体は、100nM~0.005nMまたは0.005nM未満の範囲の解離定数(KD)を有し、抗C1s抗体は、20:1~1.0:1または1.0:1未満の範囲の結合化学量論でC1sに結合し、抗C1s抗体は、6:1~1.0:1もしくは1.0:1未満の範囲の結合化学量論でC1sに結合し、及び／または、抗C1s抗体は、2.5:1~1.0:1もしくは1.0:1未満の範囲の結合化学量論でC1sに結合する。いくつかの実施形態では、抗C1s抗体は、循環または組織からのC1sのクリアランスを促進する。

【0015】

いくつかの態様では、本明細書で提供されるのは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)、VI型コラーゲン関連障害、先天性筋ジストロフィー(CMD)もしくは先天性ミオパチー、または遠位型筋ジストロフィー／ミオパチーの予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法である。方法は、対象に、C1q阻害抗体を投与することを含み得、抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を有するHVR-L1、配列番号6のアミノ酸を有するHVR-L2、及び配列番号7のアミノ酸を有するHVR-L3を含む軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号9のアミノ酸配列を有するHVR-H1、配列番号10のアミノ酸を有するHVR-H2、及び配列番号11のアミノ酸を有するHVR-H3を含む重鎖可変ドメインを含む。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】1歳の野生型、1歳のジストロフィー性、及び2歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路C1q、C3、及びC3dのタンパク質のELISAアッセイである。約1歳の野生型(WT1yo)、約1歳のmdx^{4c} (MDX1yo)及び約2歳の野生型(WT2yo)からの脛骨前部筋(TA)、横隔膜筋(DIA)及び大腿四頭筋(Q)を用いた。N=3。各試料は、Pierce(商標)BCAタンパク質アッセイキット(ThermoFisher23225)を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。p>0.05:ns;p≤0.05:*;p≤0.01:**;p≤0.001:***及びp≤0.0001:****。

【図1B】1歳の野生型、1歳のジストロフィー性、及び2歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路C1q、C3、及びC3dのタンパク質のELISAアッセイである。約1歳の野生型(WT1yo)、約1歳のmdx^{4c} (MDX1yo)及び約2歳の野生型(WT2yo)からの脛骨前部筋(TA)、横隔膜筋(DIA)及び大腿四頭筋(Q)を用いた。N=3。各試料は、Pierce(商標)BCAタンパク質アッセイキット(ThermoFisher23225)を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。p>0.05:ns;p≤0

． 0 5 : * ; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ****$ 。

【図 1 C】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ****$ 。

10

【図 1 D】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ****$ 。

20

【図 1 E】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ****$ 。

30

【図 1 F】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ****$ 。

40

【図 1 G】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ****$ 。

50

． 0 5 : * ; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ***$ ．

【図 1 H】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ***$ ．

10

【図 1 I】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ***$ ．

20

【図 1 J】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ***$ ．

30

【図 1 K】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ***$ ．

40

【図 1 L】 1 歳の野生型、1 歳のジストロフィー性、及び 2 歳の野生型の、筋肉における補体タンパク質レベルの評価を示す。古典的補体経路 C 1 q、C 3、及び C 3 d のタンパク質の E L I S A アッセイである。約 1 歳の野生型 (W T 1 y o)、約 1 歳の m d x ^{4 c} ^v (M D X 1 y o) 及び約 2 歳の野生型 (W T 2 y o) からの脛骨前部筋 (T A)、横隔膜筋 (D I A) 及び大腿四頭筋 (Q) を用いた。N = 3。各試料は、P i e r c e (商標) B C A タンパク質アッセイキット (T h e r m o F i s h e r 2 3 2 2 5) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0 . 0 5 : n s$; $p \leq 0 . 0 5 : *$; $p \leq 0 . 0 1 : **$; $p \leq 0 . 0 0 1 : ***$ 及び $p \leq 0 . 0 0 0 1 : ***$ ．

50

．05：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

【図2A】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）～及び1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、前脛骨（TA）及び大腿四頭筋（Q）におけるC1qタンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

10

【図2B】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）～及び1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、前脛骨（TA）及び大腿四頭筋（Q）におけるC1qタンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

20

【図2C】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）～及び1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、前脛骨（TA）及び大腿四頭筋（Q）におけるC1qタンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

30

【図2D】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）～及び1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、前脛骨（TA）及び大腿四頭筋（Q）におけるC1qタンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

40

【図2E】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）～及び1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、前脛骨（TA）及び大腿四頭筋（Q）におけるC1qタンパク質のELISAアッセイ

50

(グラフに示す)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3 (WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4 (WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図2F】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢(1ヶ月)、約3ヶ月齢(3ヶ月)〜及び1歳(1歳)の野生型(WT)及びmdx^{4cv}(MDX)マウスの横隔膜(DIA)、前脛骨(TA)及び大腿四頭筋(Q)におけるC1qタンパク質のELISAアッセイ(グラフに示す)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3 (WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4 (WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図2G】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢(1ヶ月)、約3ヶ月齢(3ヶ月)〜及び1歳(1歳)の野生型(WT)及びmdx^{4cv}(MDX)マウスの横隔膜(DIA)、前脛骨(TA)及び大腿四頭筋(Q)におけるC1sタンパク質のELISAアッセイ(グラフに示す)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3 (WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4 (WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図2H】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢(1ヶ月)、約3ヶ月齢(3ヶ月)〜及び1歳(1歳)の野生型(WT)及びmdx^{4cv}(MDX)マウスの横隔膜(DIA)、前脛骨(TA)及び大腿四頭筋(Q)におけるC1sタンパク質のELISAアッセイ(グラフに示す)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3 (WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4 (WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図2I】C1q及びC1s補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢(1ヶ月)、約3ヶ月齢(3ヶ月)〜及び1歳(1歳)の野生型(WT)及びmdx^{4cv}(MDX)マウスの横隔膜(DIA)、前脛骨(TA)及び大腿四頭筋(Q)におけるC1sタンパク質のELISAアッセイ(グラフに示す)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。N=3 (WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4 (WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$:

****。

【図3A】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）及び約1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、脛骨前筋（TA）及び大腿四頭筋（Q）の、C3タンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher 23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

10

【図3B】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）及び約1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、脛骨前筋（TA）及び大腿四頭筋（Q）の、C3タンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher 23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

20

【図3C】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）及び約1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、脛骨前筋（TA）及び大腿四頭筋（Q）の、C3タンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher 23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

30

【図3D】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）及び約1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、脛骨前筋（TA）及び大腿四頭筋（Q）の、C3dタンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher 23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

40

【図3E】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢（1ヶ月）、約3ヶ月齢（3ヶ月）及び約1歳（1歳）の野生型（WT）及びmdx^{4cv}（MDX）マウスの横隔膜（DIA）、脛骨前筋（TA）及び大腿四頭筋（Q）の、C3dタンパク質のELISAアッセイ（グラフに示す）。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1

50

y o、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 y o)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図3F】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢(1ヶ月)、約3ヶ月齢(3ヶ月)及び約1歳(1歳)の野生型(WT)及びmdx^{4cv}(MDX)マウスの横隔膜(DIA)、脛骨前筋(TA)及び大腿四頭筋(Q)の、C3dタンパク質のELISAアッセイ(グラフに示す)。N=3(WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4(WT 1 y o、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 y o)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

10

【図3G】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢(1ヶ月)、約3ヶ月齢(3ヶ月)及び約1歳(1歳)の野生型(WT)及びmdx^{4cv}(MDX)マウスの横隔膜(DIA)、脛骨前筋(TA)及び大腿四頭筋(Q)の、C4タンパク質のELISAアッセイ(グラフに示す)。N=3(WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4(WT 1 y o、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 y o)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

20

【図3H】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢(1ヶ月)、約3ヶ月齢(3ヶ月)及び約1歳(1歳)の野生型(WT)及びmdx^{4cv}(MDX)マウスの横隔膜(DIA)、脛骨前筋(TA)及び大腿四頭筋(Q)の、C4タンパク質のELISAアッセイ(グラフに示す)。N=3(WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4(WT 1 y o、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 y o)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

30

【図3I】C3、C3d及びC4補体タンパク質レベルが、野生型と比較してジストロフィー性筋肉において増加することを示す。約1ヶ月齢(1ヶ月)、約3ヶ月齢(3ヶ月)及び約1歳(1歳)の野生型(WT)及びmdx^{4cv}(MDX)マウスの横隔膜(DIA)、脛骨前筋(TA)及び大腿四頭筋(Q)の、C4タンパク質のELISAアッセイ(グラフに示す)。N=3(WT 1 mo、WT 3 mo)、N=4(WT 1 y o、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 y o)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***及び $p \leq 0.0001$: ****。

40

50

【図 4 A】野生型と比較して高いレベルの補体タンパク質を有するジストロフィー性マウスは、身体活動をすることができない／筋肉の衰弱を示す、ことを示す。（図 4 B～4 E）に示される行動試験で使用される約 1 ヶ月齢（1 ヶ月）、約 3 ヶ月齢（3 ヶ月）及び約 1 歳（1 歳）の野生型（WT）及び mdx^{4Cv} （MDX）マウスのマウス体重（グラム）を示す。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。行動試験は、図 2 及び 3 と同じマウスで筋肉解剖及び ELISA 分析の前に行われたことに留意されたい。データを、SEM を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

10

【図 4 B】野生型と比較して高いレベルの補体タンパク質を有するジストロフィー性マウスは、身体活動をすることができない／筋肉の衰弱を示す、ことを示す。約 1 ヶ月齢（1 ヶ月）、約 3 ヶ月齢（3 ヶ月）及び約 1 歳（1 歳）の野生型（WT）及び mdx^{4Cv} （MDX）マウスで実施したぶら下がり試験を示す。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。行動試験は、図 2 及び 3 と同じマウスで筋肉解剖及び ELISA 分析の前に行われたことに留意されたい。データを、SEM を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図 4 C】野生型と比較して高いレベルの補体タンパク質を有するジストロフィー性マウスは、身体活動をすることができない／筋肉の衰弱を示す、ことを示す。約 1 ヶ月齢（1 ヶ月）、約 3 ヶ月齢（3 ヶ月）及び約 1 歳（1 歳）の野生型（WT）及び mdx^{4Cv} （MDX）マウスで実施したオープンフィールド試験を示す。動物の各群について、総距離（m）を評価した。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。行動試験は、図 2 及び 3 と同じマウスで筋肉解剖及び ELISA 分析の前に行われたことに留意されたい。データを、SEM を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

20

【図 4 D】野生型と比較して高いレベルの補体タンパク質を有するジストロフィー性マウスは、身体活動をすることができない／筋肉の衰弱を示す、ことを示す。約 1 ヶ月齢（1 ヶ月）、約 3 ヶ月齢（3 ヶ月）及び約 1 歳（1 歳）の野生型（WT）及び mdx^{4Cv} （MDX）マウスで実施したオープンフィールド試験を示す。動物の各群について、平均速度（m/秒）を評価した。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。行動試験は、図 2 及び 3 と同じマウスで筋肉解剖及び ELISA 分析の前に行われたことに留意されたい。データを、SEM を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

30

【図 4 E】野生型と比較して高いレベルの補体タンパク質を有するジストロフィー性マウスは、身体活動をすることができない／筋肉の衰弱を示す、ことを示す。約 1 ヶ月齢（1 ヶ月）、約 3 ヶ月齢（3 ヶ月）及び約 1 歳（1 歳）の野生型（WT）及び mdx^{4Cv} （MDX）マウスで実施したオープンフィールド試験を示す。動物の各群について、移動時間（秒）を評価した。N=3（WT 1 mo、WT 3 mo）、N=4（WT 1 yo、MDX 1 mo、MDX 3 mo、MDX 1 yo）。行動試験は、図 2 及び 3 と同じマウスで筋肉解剖及び ELISA 分析の前に行われたことに留意されたい。データを、SEM を用いて平均として表す。両側非対称 t 検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

40

【図 5】ジストロフィーマウスの抗 C1q 治療の実験計画を示す。C1q 抗体処理は、1

50

0週齢で開始し、100mg/kgの腹腔内投与量(i.p.)で2回/週のレジメンで Pax7^{CreER};R26^{YFP};mdx^{4Cv}雄マウスに2週間インビボで投与した。血液試料は、薬理学的処理の開始時及び 殺時に採取した。処理の開始及び終了時に、機能パラメータ(すなわち、疲労前の最大ぶら下がり時間、ならびに走行した総距離及び平均速度などの行動活動)を評価した。

【図6A】C1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウスのバリデーションを示す。約3ヶ月齢のLyz^{Cre+/−}C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}(C1qa^{KO}, N=4)及び約3~11ヶ月齢のLyz^{Cre+/−}C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}(Cntr, N=7)の後肢筋からのFACS単離マクロファージ(CD45+F4/80+)におけるC1qa発現のqPCR分析を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05:ns;p≤0.05:*;p≤0.01:**;p≤0.001:***及びp≤0.0001:****。

【図6B】C1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウスのバリデーションを示す。約3ヶ月齢のLyz^{Cre+/−}C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}(Cntr(Cre+), N=6)、Lyz^{Cre+/−}C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}(C1qa^{KO}, N=5)、及び野生型(WT, N=3)の横隔膜及び腓腹筋におけるC1qa発現のqPCR分析を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。一方向anova試験を適用した。p>0.05:ns;p≤0.05:*;p≤0.01:**;p≤0.001:***及びp≤0.0001:****。

【図6C】C1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウスのバリデーションを示す。約3ヶ月齢のLyz^{Cre+/−}C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}(Cntr(Cre+), N=6)、Lyz^{Cre+/−}C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}(C1qa^{KO}, N=5)、及び野生型(WT, N=3)の横隔膜及び腓腹筋におけるC1qa発現のqPCR分析を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。一方向anova試験を適用した。p>0.05:ns;p≤0.05:*;p≤0.01:**;p≤0.001:***及びp≤0.0001:****。

【図7A】1ヶ月齢のC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。約1ヶ月のLyz^{Cre+/−}C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}(C1qa^{KO})及びLyz^{Cre+/−}C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}(Cntr)のマウス体重(グラム)を示す。N=9(C1qa^{KO})、N=8(Cntr)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05:ns;p≤0.05:*;p≤0.01:**;p≤0.001:***及びp≤0.0001:****。

【図7B】1ヶ月齢のC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図7A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験(HT)を示す。総ぶら下がり時間を評価した。N=9(C1qa^{KO})、N=8(Cntr)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05:ns;p≤0.05:*;p≤0.01:**;p≤0.001:***及びp≤0.0001:****。

【図7C】1ヶ月齢のC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図7A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験(HT)を示す。マウス体重について正規化された総ぶら下がり時間を評価した。N=9(C1qa^{KO})、N=8(Cntr)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05:ns;p≤0.05:*;p≤0.01:**;p≤0.001:***及びp≤0.0001:****。

【図7D】1ヶ月齢のC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図7A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド(OF)試験を示す。総距離(cm)を評価した。N=9(C1qa^{KO})、N=8(Cntr)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用い

て平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 7 E】1ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図 7 A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド (OF) 試験を示す。平均速度 (cm/秒) を評価した。N=9 (C1qa^{KO})、N=8 (C N T R)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 7 F】1ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図 7 A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド (OF) 試験を示す。移動時間のパーセンテージを評価した。N=9 (C1qa^{KO})、N=8 (C N T R)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 8 A】2ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。約2ヶ月の L y z^{Cre+/−} C1qa^{FL/FL} ; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO}) 及び L y z^{Cre+/−} C1qa^{WT/WT} ; mdx^{4Cv} (C N T R) のマウス体重 (グラム) を示す。N=4。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 8 B】2ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図 8 A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験 (HT) を示す。総ぶら下がり時間を評価した。N=4。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 8 C】2ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図 8 A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験 (HT) を示す。マウス体重について正規化された総ぶら下がり時間を評価した。N=4。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 8 D】2ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図 8 A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド (OF) 試験を示す。総距離 (cm) を評価した。N=4。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 8 E】2ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図 8 A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド (OF) 試験を示す。平均速度 (cm/秒) を評価した。N=4。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 8 F】2ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図 8 A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド (OF) 試験を示す。移動時間のパーセンテージを評価した。N=4。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。 $p > 0.05 : ns$; $p \leq 0.05 : *$; $p \leq 0.01 : **$; $p \leq 0.001 : ***$ 及び $p \leq 0.0001 : ****$ 。

【図 9 A】3ヶ月齢の C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。約3ヶ月の L y z^{Cre+/−} C1qa^{FL/FL} ; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO}) 及

び $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (CNT R) のマウス体重 (グラム) を示す。 $N=9$ ($C1qa^{KO}$)、 $N=7$ (CNT R)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p>0.05: ns$; $p\leq 0.05: *$; $p\leq 0.01: **$; $p\leq 0.001: ***$ 及び $p\leq 0.0001: ****$ 。

【図9B】3ヶ月齢の $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及び対照における行動試験を示す。(図9A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験 (HT) を示す。総ぶら下がり時間を評価した。 $N=9$ ($C1qa^{KO}$)、 $N=7$ (CNT R)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p>0.05: ns$; $p\leq 0.05: *$; $p\leq 0.01: **$; $p\leq 0.001: ***$ 及び $p\leq 0.0001: ****$ 。

10

【図9C】3ヶ月齢の $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及び対照における行動試験を示す。(図9A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験 (HT) を示す。マウス体重について正規化された総ぶら下がり時間を評価した。 $N=9$ ($C1qa^{KO}$)、 $N=7$ (CNT R)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p>0.05: ns$; $p\leq 0.05: *$; $p\leq 0.01: **$; $p\leq 0.001: ***$ 及び $p\leq 0.0001: ****$ 。

【図9D】3ヶ月齢の $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及び対照における行動試験を示す。(図9A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド (OF) 試験を示す。総距離 (cm) を評価した。 $N=9$ ($C1qa^{KO}$)、 $N=7$ (CNT R)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p>0.05: ns$; $p\leq 0.05: *$; $p\leq 0.01: **$; $p\leq 0.001: ***$ 及び $p\leq 0.0001: ****$ 。

20

【図9E】3ヶ月齢の $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及び対照における行動試験を示す。(図9A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド (OF) 試験を示す。平均速度 (cm/秒) を評価した。 $N=9$ ($C1qa^{KO}$)、 $N=7$ (CNT R)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p>0.05: ns$; $p\leq 0.05: *$; $p\leq 0.01: **$; $p\leq 0.001: ***$ 及び $p\leq 0.0001: ****$ 。

30

【図9F】3ヶ月齢の $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及び対照における行動試験を示す。(図9A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド (OF) 試験を示す。移動時間のパーセンテージを評価した。 $N=9$ ($C1qa^{KO}$)、 $N=7$ (CNT R)。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p>0.05: ns$; $p\leq 0.05: *$; $p\leq 0.01: **$; $p\leq 0.001: ***$ 及び $p\leq 0.0001: ****$ 。

【図10A】抗 $C1q$ 抗体で処理した3ヶ月齢のジストロフィーマウスにおける行動試験を示す。処理の前 (プレ) 及び後 (ポスト) に、抗 $C1q$ ブロッキング抗体 (抗 $C1q$) または対照抗体 (Cnt r) で処理した $Pax7^{CreER}; R26^{YFP}; mdx^{4Cv}$ マウスのマウス重量 (グラム) を示す。 $N=6$ 。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p>0.05: ns$; $p\leq 0.05: *$; $p\leq 0.01: **$; $p\leq 0.001: ***$ 及び $p\leq 0.0001: ****$ 。

40

【図10B】抗 $C1q$ 抗体で処理した3ヶ月齢のジストロフィーマウスにおける行動試験を示す。(図10A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験 (HT) を示す。総ぶら下がり時間を評価した。 $N=6$ 。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p>0.05: ns$; $p\leq 0.05: *$; $p\leq 0.01: **$; $p\leq 0.001: ***$ 及び $p\leq 0.0001: ****$ 。

50

1:***及び $p \leq 0.0001$:***。

【図10C】抗C1q抗体で処理した3ヶ月齢のジストロフィーマウスにおける行動試験を示す。(図10A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験(HT)を示す。マウス体重について正規化された総ぶら下がり時間を評価した。 $N=6$ 。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$:ns; $p \leq 0.05$:*; $p \leq 0.01$:**; $p \leq 0.001$:***及び $p \leq 0.0001$:***。

【図10D】抗C1q抗体で処理した3ヶ月齢のジストロフィーマウスにおける行動試験を示す。(図10A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド(OF)試験を示す。総距離(cm)を評価した。 $N=6$ 。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$:ns; $p \leq 0.05$:*; $p \leq 0.01$:**; $p \leq 0.001$:***及び $p \leq 0.0001$:***。

【図10E】抗C1q抗体で処理した3ヶ月齢のジストロフィーマウスにおける行動試験を示す。(図10A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド(OF)試験を示す。平均速度(cm/秒)を評価した。 $N=6$ 。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$:ns; $p \leq 0.05$:*; $p \leq 0.01$:**; $p \leq 0.001$:***及び $p \leq 0.0001$:***。

【図10F】抗C1q抗体で処理した3ヶ月齢のジストロフィーマウスにおける行動試験を示す。(図10A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド(OF)試験を示す。移動時間のパーセンテージを評価した。 $N=6$ 。試験を1日おきに3回繰り返した。各試験の3日間の平均値を示す。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$:ns; $p \leq 0.05$:*; $p \leq 0.01$:**; $p \leq 0.001$:***及び $p \leq 0.0001$:***。

【図11A】C1qa^{KO};mdx^{4CV}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの横隔膜における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4CV}(C1qa^{KO}(Cre⁺))、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4CV}(CNT^R(Cre⁺))、野生型(WT)、Pax7^{CreER};R26^{RYFP};mdx^{4CV}マウスの横隔膜のTgfβ遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体(抗C1q)または対照抗体(Cntr)で処理した。 $N=6$ (CNT^R(Cre⁺))、 $N=5$ (C1qa^{KO}、Cntr、抗C1q)、 $N=3$ (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$:ns; $p \leq 0.05$:*; $p \leq 0.01$:**; $p \leq 0.001$:***; $p \leq 0.0001$:****。

【図11B】C1qa^{KO};mdx^{4CV}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの横隔膜における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4CV}(C1qa^{KO}(Cre⁺))、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4CV}(CNT^R(Cre⁺))、野生型(WT)、Pax7^{CreER};R26^{RYFP};mdx^{4CV}マウスの横隔膜のLgr5遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体(抗C1q)または対照抗体(Cntr)で処理した。 $N=6$ (CNT^R(Cre⁺))、 $N=5$ (C1qa^{KO}、Cntr、抗C1q)、 $N=3$ (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$:ns; $p \leq 0.05$:*; $p \leq 0.01$:**; $p \leq 0.001$:***; $p \leq 0.0001$:****。

【図11C】C1qa^{KO};mdx^{4CV}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの横隔膜における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4CV}(C1qa^{KO}(Cre⁺))、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4CV}(CNT^R(Cre⁺))、野生型(WT)、Pax7^{CreER};R26^{RYFP};mdx^{4CV}マウスの

横隔膜のコラーゲン1 α 1遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

【図11D】C1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの横隔膜における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER};R26^{RYFP};mdx^{4Cv}マウスの横隔膜のコラーゲン3 α 1遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

10

【図11E】C1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの横隔膜における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER};R26^{RYFP};mdx^{4Cv}マウスの横隔膜のフィブロネクチン遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

20

【図12A】C1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの腓腹筋における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER};R26^{RYFP};mdx^{4Cv}マウスの腓腹筋のTgf β 遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

30

【図12B】C1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの腓腹筋における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER};R26^{RYFP};mdx^{4Cv}マウスの腓腹筋のLgr5遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

40

【図12C】C1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの腓腹筋における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER};R26^{RYFP};mdx^{4Cv}マウスの

50

腓腹筋のコラーゲン1 α 1遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

【図12D】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの腓腹筋における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの腓腹筋のコラーゲン3 α 1遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

10

【図12E】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの腓腹筋における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの腓腹筋のフィブロネクチン遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

20

【図13A】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの線維/脂肪原性前駆細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの線維/脂肪原性前駆細胞のTg β 遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

30

【図13B】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの線維/脂肪原性前駆細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}（C1qaKO（Cre+））、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}（CNTR（Cre+））、野生型（WT）、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの線維/脂肪原性前駆細胞のLgr5遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体（抗C1q）または対照抗体（Cntr）で処理した。N=6（CNTR（Cre+）、N=5（C1qaKO、Cntr、抗C1q）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

40

【図13C】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの線維/脂肪原性前駆細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}

50

^{v} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT}/WT; mdx^{4Cv} (CNTR (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの線維/脂肪原性前駆細胞のAxin2遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cntr) で処理した。N=6 (CNTR (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cntr、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05: ns; p≤0.05: *; p≤0.01: **; p≤0.001: ***; p≤0.0001: ****。

【図13D】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの線維/脂肪原性前駆細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL}/FL; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT}/WT; mdx^{4Cv} (CNTR (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの線維/脂肪原性前駆細胞のコラーゲン1a1遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cntr) で処理した。N=6 (CNTR (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cntr、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05: ns; p≤0.05: *; p≤0.01: **; p≤0.001: ***; p≤0.0001: ****。

【図13E】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの線維/脂肪原性前駆細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL}/FL; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT}/WT; mdx^{4Cv} (CNTR (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの線維/脂肪原性前駆細胞のコラーゲン3a1遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cntr) で処理した。N=6 (CNTR (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cntr、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05: ns; p≤0.05: *; p≤0.01: **; p≤0.001: ***; p≤0.0001: ****。

【図13F】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの線維/脂肪原性前駆細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL}/FL; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT}/WT; mdx^{4Cv} (CNTR (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの線維/脂肪原性前駆細胞のフィブロネクチン遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cntr) で処理した。N=6 (CNTR (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cntr、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05: ns; p≤0.05: *; p≤0.01: **; p≤0.001: ***; p≤0.0001: ****。

【図14A】C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの衛生細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/− C1qa^{FL}/FL; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/− C1qa^{WT}/WT; mdx^{4Cv} (CNTR (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER}; R26^{RYFP}; mdx^{4Cv}マウスの衛生細胞のTgfβ遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cntr) で処理した。N=6 (CNTR (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cntr、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。p>0.05: ns; p≤0.05: *; p≤0

. 01 : ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****.

【図14B】C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの衛生細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/−C1qa^{FL/FL} ; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/−C1qa^{WT/WT} ; mdx^{4Cv} (CNT^R (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER} ; R26^{RYFP} ; mdx^{4Cv}マウスの衛生細胞のLgr5遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cnt^r) で処理した。N=6 (CNT^R (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cnt^r、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****.

【図14C】C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの衛生細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/−C1qa^{FL/FL} ; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/−C1qa^{WT/WT} ; mdx^{4Cv} (CNT^R (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER} ; R26^{RYFP} ; mdx^{4Cv}マウスの衛生細胞のAxin2遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cnt^r) で処理した。N=6 (CNT^R (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cnt^r、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****.

【図14D】C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの衛生細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/−C1qa^{FL/FL} ; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/−C1qa^{WT/WT} ; mdx^{4Cv} (CNT^R (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER} ; R26^{RYFP} ; mdx^{4Cv}マウスの衛生細胞のコラーゲン1a1遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cnt^r) で処理した。N=6 (CNT^R (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cnt^r、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****.

【図14E】C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの衛生細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/−C1qa^{FL/FL} ; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/−C1qa^{WT/WT} ; mdx^{4Cv} (CNT^R (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER} ; R26^{RYFP} ; mdx^{4Cv}マウスの衛生細胞のコラーゲン3a1遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cnt^r) で処理した。N=6 (CNT^R (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cnt^r、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****.

【図14F】C1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び抗C1q抗体で処理されたジストロフィーマウスの衛生細胞における正規のWntシグナル伝達及び線維原性関連遺伝子の発現を示す。約3ヶ月のLy^z Cre⁺/−C1qa^{FL/FL} ; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} (Cre⁺))、Ly^z Cre⁺/−C1qa^{WT/WT} ; mdx^{4Cv} (CNT^R (Cre⁺))、野生型 (WT)、Pax7^{CreER} ; R26^{RYFP} ; mdx^{4Cv}マウスの衛生細胞のフィブロネクチン遺伝子のqPCR分析では、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cnt^r) で処理した。N=6 (CNT^R (Cre⁺))、N=5 (C1qa^{KO}、Cnt^r、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: *

; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

【図15A】抗C1q抗体で処理したジストロフィー性C1qaKOマウス及びジストロフィー性マウス由来の血清におけるクレアチンキナーゼ試験を示す。約3ヶ月齢 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO (Cre+))、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (CNT (Cre+)) 及び野生型 (WT) から採取した血清試料中で測定したCK活性 (nmol/min/mL) を示す。N=6 (CNT (Cre+))、N=5 (C1qaKO、Cnt、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。一方向ANOVA試験を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

10

【図15B】抗C1q抗体で処理したジストロフィー性C1qaKOマウス及びジストロフィー性マウス由来の血清におけるクレアチンキナーゼ試験を示す。 $Pax7^{CreER}; R26YFP; mdx^{4Cv}$ マウスから採取された血清試料中で測定されたCK活性 (nmol/min/mL) を、C1qブロッキング抗体 (抗C1q) または対照抗体 (Cnt) で処理する前 (プレ) 及び後 (ポスト) について示す。N=6 (CNT (Cre+))、N=5 (C1qaKO、Cnt、抗C1q)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。一方向ANOVA試験を適用した。 $p > 0.05$: ns; $p \leq 0.05$: *; $p \leq 0.01$: **; $p \leq 0.001$: ***; $p \leq 0.0001$: ****。

20

【図16A】抗C1q抗体で処理したC1qaKO; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスから採取した血漿中の補体レベルの評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、及びC1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。血漿試料を、以下の動物から採取した: 処理の前 (プレ) 及び後 (ポスト) に抗C1qブロッキング抗体 (グラフ内でBとして示す) で処理したマウス、処理の前 (プレ) 及び後 (ポスト) に対照抗体 (グラフ内でAとして示す) で処理したマウス、1ヶ月齢及び 殺 (3ヶ月齢) の $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺 (3ヶ月齢) の $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cnt Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺 (3ヶ月齢) の $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cnt Cre-) マウス、及び3ヶ月齢の野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre+)、N=6 (Cnt Cre+)、N=4 (Cnt Cre-)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

30

【図16B】抗C1q抗体で処理したC1qaKO; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスから採取した血漿中の補体レベルの評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、及びC1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。血漿試料を、以下の動物から採取した: 処理の前 (プレ) 及び後 (ポスト) に抗C1qブロッキング抗体 (グラフ内でBとして示す) で処理したマウス、処理の前 (プレ) 及び後 (ポスト) に対照抗体 (グラフ内でAとして示す) で処理したマウス、1ヶ月齢及び 殺 (3ヶ月齢) の $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺 (3ヶ月齢) の $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cnt Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺 (3ヶ月齢) の $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cnt Cre-) マウス、及び3ヶ月齢の野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre+)、N=6 (Cnt Cre+)、N=4 (Cnt Cre-)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

40

【図16C】抗C1q抗体で処理したC1qaKO; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフ

50

マウスから採取した血漿中の補体レベルの評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、及びC1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。血漿試料を、以下の動物から採取した：処理の前（プレ）及び後（ポスト）に抗C1qブロッキング抗体（グラフ内でBとして示す）で処理したマウス、処理の前（プレ）及び後（ポスト）に对照抗体（グラフ内でAとして示す）で処理したマウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{re+/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} (C1qaKO Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{Cre+/-}C1qa^{WT/WT}$; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{re-/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} または $Ly\epsilon^{Cre-/-}C1qa^{WT/FL}$; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-) マウス、及び3ヶ月齢の野生型（WT）。N=5（A、B、C1qaKO Cre+）、N=6（Cntr Cre+）、N=4（Cntr Cre-）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。

10

【図16D】抗C1q抗体で処理したC1qaKO ; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスから採取した血漿中の補体レベルの評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、及びC1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。血漿試料を、以下の動物から採取した：処理の前（プレ）及び後（ポスト）に抗C1qブロッキング抗体（グラフ内でBとして示す）で処理したマウス、処理の前（プレ）及び後（ポスト）に对照抗体（グラフ内でAとして示す）で処理したマウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{re+/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} (C1qaKO Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{Cre+/-}C1qa^{WT/WT}$; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{re-/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} または $Ly\epsilon^{Cre-/-}C1qa^{WT/FL}$; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-) マウス、及び3ヶ月齢の野生型（WT）。N=5（A、B、C1qaKO Cre+）、N=6（Cntr Cre+）、N=4（Cntr Cre-）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。

20

【図16E】抗C1q抗体で処理したC1qaKO ; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスから採取した血漿中の補体レベルの評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、及びC1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。血漿試料を、以下の動物から採取した：処理の前（プレ）及び後（ポスト）に抗C1qブロッキング抗体（グラフ内でBとして示す）で処理したマウス、処理の前（プレ）及び後（ポスト）に对照抗体（グラフ内でAとして示す）で処理したマウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{re+/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} (C1qaKO Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{Cre+/-}C1qa^{WT/WT}$; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+) マウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\epsilon^{re-/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} または $Ly\epsilon^{Cre-/-}C1qa^{WT/FL}$; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-) マウス、及び3ヶ月齢の野生型（WT）。N=5（A、B、C1qaKO Cre+）、N=6（Cntr Cre+）、N=4（Cntr Cre-）、N=3（WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。

30

40

【図16F】抗C1q抗体で処理したC1qaKO ; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスから採取した血漿中の補体レベルの評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、及びC1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。血漿試料を、以下の動物から採取した：処理の前（プレ）及び後（ポスト）に抗C1qブロッキング抗体（グラフ内でBとして示す）で処理

50

したマウス、処理の前（プレ）及び後（ポスト）に対照抗体（グラフ内でAとして示す）で処理したマウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\zeta^{Cre+/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} ($C1qa^{KO} Cre+$) マウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\zeta^{Cre+/-}C1qa^{WT/WT}$; mdx^{4Cv} ($Cntr Cre+$) マウス、1ヶ月齢及び 殺（3ヶ月齢）の $Ly\zeta^{Cre-/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} または $Ly\zeta^{Cre-/-}C1qa^{WT/FL}$; mdx^{4Cv} ($Cntr Cre-$) マウス、及び3ヶ月齢の野生型 (WT)。N=5 (A、B、 $C1qa^{KO} Cre+$)、N=6 ($Cntr Cre+$)、N=4 ($Cntr Cre-$)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図17A】抗C1q抗体で処理した $C1qa^{KO}$; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 ($C1sC1inh$)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly\zeta^{Cre+/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} ($C1qa^{KO} Cre+$) マウス、 $Ly\zeta^{Cre+/-}C1qa^{WT/WT}$; mdx^{4Cv} ($Cntr Cre+$) マウス、 $Ly\zeta^{Cre-/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} または $Ly\zeta^{Cre-/-}C1qa^{WT/FL}$; mdx^{4Cv} ($Cntr Cre-$) マウス、及び野生型 (WT)。N=4 (A、B、 $C1qa^{KO} Cre+$ 、 $Cntr Cre+$)、N=3 ($Cntr Cre-$ 、WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図17B】抗C1q抗体で処理した $C1qa^{KO}$; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 ($C1sC1inh$)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly\zeta^{Cre+/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} ($C1qa^{KO} Cre+$) マウス、 $Ly\zeta^{Cre+/-}C1qa^{WT/WT}$; mdx^{4Cv} ($Cntr Cre+$) マウス、 $Ly\zeta^{Cre-/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} または $Ly\zeta^{Cre-/-}C1qa^{WT/FL}$; mdx^{4Cv} ($Cntr Cre-$) マウス、及び野生型 (WT)。N=4 (A、B、 $C1qa^{KO} Cre+$ 、 $Cntr Cre+$)、N=3 ($Cntr Cre-$ 、WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図17C】抗C1q抗体で処理した $C1qa^{KO}$; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 ($C1sC1inh$)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly\zeta^{Cre+/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} ($C1qa^{KO} Cre+$) マウス、 $Ly\zeta^{Cre+/-}C1qa^{WT/WT}$; mdx^{4Cv} ($Cntr Cre+$) マウス、 $Ly\zeta^{Cre-/-}C1qa^{FL/FL}$; mdx^{4Cv} または $Ly\zeta^{Cre-/-}C1qa^{WT/FL}$; mdx^{4Cv} ($Cntr Cre-$) マウス、及び野生型 (WT)。N=4 (A、B、 $C1qa^{KO} Cre+$ 、 $Cntr Cre+$)、N=3 ($Cntr Cre-$ 、WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図17D】抗C1q抗体で処理した $C1qa^{KO}$; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q

、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型(WT)。N=4(A、B、C1qa^{KO} Cre+、Cntr Cre+)、N=3(Cntr Cre-、WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

10

【図17E】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型(WT)。N=4(A、B、C1qa^{KO} Cre+、Cntr Cre+)、N=3(Cntr Cre-、WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

20

【図17F】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型(WT)。N=4(A、B、C1qa^{KO} Cre+、Cntr Cre+)、N=3(Cntr Cre-、WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

30

【図17G】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型(WT)。N=4(A、B、C1qa^{KO} Cre+、Cntr Cre+)、N=3(Cntr Cre-、WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

40

50

【図18A】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre+）マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre+）マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre−）マウス、及び野生型（WT）。N=4（A、B、C1qa^{KO} Cre+、Cntr Cre+）、N=3（Cntr Cre−、WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

10

【図18B】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre+）マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre+）マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre−）マウス、及び野生型（WT）。N=4（A、B、C1qa^{KO} Cre+、Cntr Cre+）、N=3（Cntr Cre−、WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

20

30

【図18C】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre+）マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre+）マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre−）マウス、及び野生型（WT）。N=4（A、B、C1qa^{KO} Cre+、Cntr Cre+）、N=3（Cntr Cre−、WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

40

【図18D】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経

50

路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ （C1qaKO Cre+）マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ （Cntr Cre+）マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ （Cntr Cre-）マウス、及び野生型（WT）。N=4（A、B、C1qaKO Cre+、Cntr Cre+）、N=3（Cntr Cre-、WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図18E】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qaKO;mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ （C1qaKO Cre+）マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ （Cntr Cre+）マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ （Cntr Cre-）マウス、及び野生型（WT）。N=4（A、B、C1qaKO Cre+、Cntr Cre+）、N=3（Cntr Cre-、WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図18F】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qaKO;mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ （C1qaKO Cre+）マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ （Cntr Cre+）マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ （Cntr Cre-）マウス、及び野生型（WT）。N=4（A、B、C1qaKO Cre+、Cntr Cre+）、N=3（Cntr Cre-、WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図18G】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qaKO;mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質の

ELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre-) マウス、及び野生型 (WT)。N=4 (A、B、C1qaKO Cre+、Cntr Cre+)、N=3 (Cntr Cre-、WT)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図18H】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre-) マウス、及び野生型 (WT)。N=4 (A、B、C1qaKO Cre+、Cntr Cre+)、N=3 (Cntr Cre-、WT)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図18I】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの横隔膜における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から横隔膜を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre-) マウス、及び野生型 (WT)。N=4 (A、B、C1qaKO Cre+、Cntr Cre+)、N=3 (Cntr Cre-、WT)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図19A】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bと

して示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型(WT)。N=5(A、B、 $C1qa^{KO} Cre+$)、N=4($Cntr Cre-$)、N=6($Cntr Cre+$)、N=3(WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図19B】抗C1q抗体で処理した $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した:抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型(WT)。N=5(A、B、 $C1qa^{KO} Cre+$)、N=4($Cntr Cre-$)、N=6($Cntr Cre+$)、N=3(WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図19C】抗C1q抗体で処理した $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した:抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型(WT)。N=5(A、B、 $C1qa^{KO} Cre+$)、N=4($Cntr Cre-$)、N=6($Cntr Cre+$)、N=3(WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図19D】抗C1q抗体で処理した $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した:抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型(WT)。N=5(A、B、 $C1qa^{KO} Cre+$)、N=4($Cntr Cre-$)、N=6($Cntr Cre+$)、N=3(WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図19E】抗C1q抗体で処理した $C1qa^{KO}; mdx^{4Cv}$ マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。

PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qa^{KO} Cre+)、N=4 (Cntr Cre-)、N=6 (Cntr Cre+)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図19F】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qa^{KO} Cre+)、N=4 (Cntr Cre-)、N=6 (Cntr Cre+)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図19G】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qa^{KO} Cre+)、N=4 (Cntr Cre-)、N=6 (Cntr Cre+)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20A】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO} Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre+)$ マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cntr Cre-)$ マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qa^{KO} Cre+)、N=4 (Cntr Cre-)、N=6 (Cntr Cre+)、N=3 (WT)。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることに

よって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20B】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Ly^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre⁺）マウス、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre⁺）マウス、Ly^zCre[−]/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLy^zCre[−]/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre[−]）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qa^{KO} Cre⁺）、N=4（Cntr Cre[−]）、N=6（Cntr Cre⁺）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

10

【図20C】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Ly^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre⁺）マウス、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre⁺）マウス、Ly^zCre[−]/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLy^zCre[−]/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre[−]）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qa^{KO} Cre⁺）、N=4（Cntr Cre[−]）、N=6（Cntr Cre⁺）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

20

30

【図20D】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Ly^zCre⁺/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre⁺）マウス、Ly^zCre⁺/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre⁺）マウス、Ly^zCre[−]/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLy^zCre[−]/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre[−]）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qa^{KO} Cre⁺）、N=4（Cntr Cre[−]）、N=6（Cntr Cre⁺）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセ

40

50

イキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20E】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre+）マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre+）マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre−）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qa^{KO} Cre+）、N=4（Cntr Cre−）、N=6（Cntr Cre+）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher 23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20F】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre+）マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre+）マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre−）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qa^{KO} Cre+）、N=4（Cntr Cre−）、N=6（Cntr Cre+）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher 23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20G】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}（C1qa^{KO} Cre+）マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}（Cntr Cre+）マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}（Cntr Cre−）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qa^{KO} Cre+）、N=4（Cntr Cre−）、N=6（Cntr

Cre+)、N=3(WT)。各試料は、Pierce(商標)BCAタンパク質アッセイキット(ThermoFisher23225)を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20H】抗C1q抗体(総タンパク補正済)で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質(またはタンパク質複合体)/総タンパク質比として表す。 殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した:抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}(C1qa^{KO} Cre+)マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}(Cntr Cre+)マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}(Cntr Cre−)マウス、及び野生型(WT)。N=5(A、B、C1qa^{KO} Cre+)、N=4(Cntr Cre−)、N=6(Cntr Cre+)、N=3(WT)。各試料は、Pierce(商標)BCAタンパク質アッセイキット(ThermoFisher23225)を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20I】抗C1q抗体(総タンパク補正済)で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質(またはタンパク質複合体)/総タンパク質比として表す。 殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した:抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}(C1qa^{KO} Cre+)マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}(Cntr Cre+)マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}(Cntr Cre−)マウス、及び野生型(WT)。N=5(A、B、C1qa^{KO} Cre+)、N=4(Cntr Cre−)、N=6(Cntr Cre+)、N=3(WT)。各試料は、Pierce(商標)BCAタンパク質アッセイキット(ThermoFisher23225)を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20J】抗C1q抗体(総タンパク補正済)で処理したC1qa^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路(すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体(IC)、C1s-C1阻害剤複合体(C1sC1inh)、及びアルブミン(Alb)のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質(またはタンパク質複合体)/総タンパク質比として表す。 殺(3ヶ月齢)時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した:抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス(グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス(グラフ中Aとして示す)、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}(C1qa^{KO} Cre+)マウス、Lyz^{Cre+}/−C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}(Cntr Cre+)マウス、Lyz^{Cre−}/−C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}またはLyz^{Cre−}/−C1qa^{WT/FL};mdx^{4Cv}(Cntr Cre−)マウス、及び野生型(WT)。N=5(

A、B、C1qaKO Cre+）、N=4（Cnt Cre-）、N=6（Cnt Cre+）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20K】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qaKO；mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz Cre+／-C1qa^{FL/FL}；mdx^{4Cv}（C1qaKO Cre+）マウス、Lyz Cre+／-C1qa^{WT/WT}；mdx^{4Cv}（Cnt Cre+）マウス、Lyz Cre-／-C1qa^{FL/FL}；mdx^{4Cv}またはLyz Cre-／-C1qa^{WT/FL}；mdx^{4Cv}（Cnt Cre-）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qaKO Cre+）、N=4（Cnt Cre-）、N=6（Cnt Cre+）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20L】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qaKO；mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz Cre+／-C1qa^{FL/FL}；mdx^{4Cv}（C1qaKO Cre+）マウス、Lyz Cre+／-C1qa^{WT/WT}；mdx^{4Cv}（Cnt Cre+）マウス、Lyz Cre-／-C1qa^{FL/FL}；mdx^{4Cv}またはLyz Cre-／-C1qa^{WT/FL}；mdx^{4Cv}（Cnt Cre-）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qaKO Cre+）、N=4（Cnt Cre-）、N=6（Cnt Cre+）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図20M】抗C1q抗体（総タンパク補正済）で処理したC1qaKO；mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスの腓腹筋における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）、C1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）、及びアルブミン（Alb）のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。全てのデータを、タンパク質（またはタンパク質複合体）／総タンパク質比として表す。 殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から腓腹筋を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、Lyz Cre+／-C1qa^{FL/FL}；mdx^{4Cv}（C1qaKO Cre+）マウス、Lyz Cre+／-C1qa^{WT/WT}；mdx^{4Cv}（Cnt Cre+）マウス、Lyz Cre-／-C1qa^{FL/FL}；mdx^{4Cv}またはLyz Cre-／-C1qa^{WT/FL}；mdx^{4Cv}（Cnt Cre-）マウス、及び野生型（WT）。N=5（A、B、C1qaKO Cre+）、N=4（Cnt Cre-）、N=6（Cnt Cre+）、N=3（WT）。各試料は、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（ThermoFisher23225）を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

WT/FL; mdx^{4Cv} (Cnt^r Cre⁻) マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre⁺)、N=4 (Cnt^r Cre⁻)、N=6 (Cnt^r Cre⁺)、N=3 (WT)。各試料は、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (ThermoFisher 23225) を使用して試料の測定値で割ることによって、総タンパク質レベルに正規化される。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図21A】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの肝臓における補体レベル評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺 (3ヶ月齢) 時点で、以下の動物から肝臓を採取した: 抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス (グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス (グラフ中Aとして示す)、Lyz^{Cre⁺/-}C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qaKO Cre⁺) マウス、Lyz^{Cre⁺/-}C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cnt^r Cre⁺) マウス、Lyz^{Cre⁻/-}C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} または Lyz^{Cre⁻/-}C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cnt^r Cre⁻) マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre⁺)、N=4 (Cnt^r Cre⁻)、N=6 (Cnt^r Cre⁺)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図21B】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの肝臓における補体レベル評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺 (3ヶ月齢) 時点で、以下の動物から肝臓を採取した: 抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス (グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス (グラフ中Aとして示す)、Lyz^{Cre⁺/-}C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qaKO Cre⁺) マウス、Lyz^{Cre⁺/-}C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cnt^r Cre⁺) マウス、Lyz^{Cre⁻/-}C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} または Lyz^{Cre⁻/-}C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cnt^r Cre⁻) マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre⁺)、N=4 (Cnt^r Cre⁻)、N=6 (Cnt^r Cre⁺)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図21C】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの肝臓における補体レベル評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺 (3ヶ月齢) 時点で、以下の動物から肝臓を採取した: 抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス (グラフ中Bとして示す)、対照抗体で処理したマウス (グラフ中Aとして示す)、Lyz^{Cre⁺/-}C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} (C1qaKO Cre⁺) マウス、Lyz^{Cre⁺/-}C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv} (Cnt^r Cre⁺) マウス、Lyz^{Cre⁻/-}C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv} または Lyz^{Cre⁻/-}C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv} (Cnt^r Cre⁻) マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre⁺)、N=4 (Cnt^r Cre⁻)、N=6 (Cnt^r Cre⁺)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図21D】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの肝臓における補体レベル評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C1q、C3d及びC1s)、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺 (3ヶ月齢) 時点で、以下の動物

物から肝臓を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre-) マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre+)、N=4 (Cntr Cre-)、N=6 (Cntr Cre+)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図21E】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの肝臓における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から肝臓を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre-) マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre+)、N=4 (Cntr Cre-)、N=6 (Cntr Cre+)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図21F】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの肝臓における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から肝臓を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre-) マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre+)、N=4 (Cntr Cre-)、N=6 (Cntr Cre+)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図21G】抗C1q抗体で処理したC1qa^{KO}; mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスの肝臓における補体レベル評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン (Alb) のタンパク質のELISAアッセイ。PKは、試料中のC1qブロッキング抗体の量を示す。殺（3ヶ月齢）時点で、以下の動物から肝臓を採取した：抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（グラフ中Bとして示す）、対照抗体で処理したマウス（グラフ中Aとして示す）、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ (C1qaKO Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre+/-} C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre+) マウス、 $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}$ または $Ly z^{Cre-/-} C1qa^{WT/FL}; mdx^{4Cv}$ (Cntr Cre-) マウス、及び野生型 (WT)。N=5 (A、B、C1qaKO Cre+)、N=4 (Cntr Cre-)、N=6 (Cntr Cre+)、N=3 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。

【図22A】抗C1q抗体で処理したジストロフィーマウスの心臓における補体レベルの評価を示す。古典的補体経路（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体 (IC)、C1s-C1阻害剤複合体 (C1sC1inh)、及びアルブミン

(A l b) のタンパク質の E L I S A アッセイ。P K は、試料中の C 1 q ブロッキング抗体の量を示す。心臓を、抗 C 1 q ブロッキング抗体 (グラフでは B として示す) で処理したマウス及び対照抗体 (グラフでは A として示す) で処理したマウスから、殺 (3 ヶ月齢) 時点で採取した; N = 5。データを、S E M を用いて平均として表す。

【図 2 2 B】抗 C 1 q 抗体で処理したジストロフィーマウスの心臓における補体レベルの評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C 1 q、C 3 d 及び C 1 s)、C 1 q - C 3 d 免疫複合体 (I C)、C 1 s - C 1 阻害剤複合体 (C 1 s C 1 i n h)、及びアルブミン (A l b) のタンパク質の E L I S A アッセイ。P K は、試料中の C 1 q ブロッキング抗体の量を示す。心臓を、抗 C 1 q ブロッキング抗体 (グラフでは B として示す) で処理したマウス及び対照抗体 (グラフでは A として示す) で処理したマウスから、殺 (3 ヶ月齢) 時点で採取した; N = 5。データを、S E M を用いて平均として表す。 10

【図 2 2 C】抗 C 1 q 抗体で処理したジストロフィーマウスの心臓における補体レベルの評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C 1 q、C 3 d 及び C 1 s)、C 1 q - C 3 d 免疫複合体 (I C)、C 1 s - C 1 阻害剤複合体 (C 1 s C 1 i n h)、及びアルブミン (A l b) のタンパク質の E L I S A アッセイ。P K は、試料中の C 1 q ブロッキング抗体の量を示す。心臓を、抗 C 1 q ブロッキング抗体 (グラフでは B として示す) で処理したマウス及び対照抗体 (グラフでは A として示す) で処理したマウスから、殺 (3 ヶ月齢) 時点で採取した; N = 5。データを、S E M を用いて平均として表す。

【図 2 2 D】抗 C 1 q 抗体で処理したジストロフィーマウスの心臓における補体レベルの評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C 1 q、C 3 d 及び C 1 s)、C 1 q - C 3 d 免疫複合体 (I C)、C 1 s - C 1 阻害剤複合体 (C 1 s C 1 i n h)、及びアルブミン (A l b) のタンパク質の E L I S A アッセイ。P K は、試料中の C 1 q ブロッキング抗体の量を示す。心臓を、抗 C 1 q ブロッキング抗体 (グラフでは B として示す) で処理したマウス及び対照抗体 (グラフでは A として示す) で処理したマウスから、殺 (3 ヶ月齢) 時点で採取した; N = 5。データを、S E M を用いて平均として表す。 20

【図 2 2 E】抗 C 1 q 抗体で処理したジストロフィーマウスの心臓における補体レベルの評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C 1 q、C 3 d 及び C 1 s)、C 1 q - C 3 d 免疫複合体 (I C)、C 1 s - C 1 阻害剤複合体 (C 1 s C 1 i n h)、及びアルブミン (A l b) のタンパク質の E L I S A アッセイ。P K は、試料中の C 1 q ブロッキング抗体の量を示す。心臓を、抗 C 1 q ブロッキング抗体 (グラフでは B として示す) で処理したマウス及び対照抗体 (グラフでは A として示す) で処理したマウスから、殺 (3 ヶ月齢) 時点で採取した; N = 5。データを、S E M を用いて平均として表す。 30

【図 2 2 F】抗 C 1 q 抗体で処理したジストロフィーマウスの心臓における補体レベルの評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C 1 q、C 3 d 及び C 1 s)、C 1 q - C 3 d 免疫複合体 (I C)、C 1 s - C 1 阻害剤複合体 (C 1 s C 1 i n h)、及びアルブミン (A l b) のタンパク質の E L I S A アッセイ。P K は、試料中の C 1 q ブロッキング抗体の量を示す。心臓を、抗 C 1 q ブロッキング抗体 (グラフでは B として示す) で処理したマウス及び対照抗体 (グラフでは A として示す) で処理したマウスから、殺 (3 ヶ月齢) 時点で採取した; N = 5。データを、S E M を用いて平均として表す。

【図 2 2 G】抗 C 1 q 抗体で処理したジストロフィーマウスの心臓における補体レベルの評価を示す。古典的補体経路 (すなわち、C 1 q、C 3 d 及び C 1 s)、C 1 q - C 3 d 免疫複合体 (I C)、C 1 s - C 1 阻害剤複合体 (C 1 s C 1 i n h)、及びアルブミン (A l b) のタンパク質の E L I S A アッセイ。P K は、試料中の C 1 q ブロッキング抗体の量を示す。心臓を、抗 C 1 q ブロッキング抗体 (グラフでは B として示す) で処理したマウス及び対照抗体 (グラフでは A として示す) で処理したマウスから、殺 (3 ヶ月齢) 時点で採取した; N = 5。データを、S E M を用いて平均として表す。 40

【図 2 3】C 1 複合体成分の発現がジストロフィー性筋肉において増強されることを示す。約 1 歳の野生型 (W T) 及び m d x C v (M d x) マウスの後肢筋における C 1 複合体サブユニット C 1 q a、C 1 q b、C 1 q c、C 1 r、C 1 s の m R N A 発現。N = 3。データを、S E M を用いて平均として表す。両側非対合 t 検定を適用した。p > 0 . 0 5 50

: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****。

【図24A】C1qサブユニットが、ジストロフィーマウスの骨格筋内にマクロファージを浸潤させることによって発現されることを示す。約1歳の野生型(WT)及びmdx^{4Cv}(Mdx)の後肢筋肉から単離した衛星細胞(SC)、マクロファージ(MAC)及び線維性/脂肪原性前駆細胞(FAP)におけるC1qa発現のqPCR分析を示す。N=3。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****。

【図24B】C1qサブユニットが、ジストロフィーマウスの骨格筋内にマクロファージを浸潤させることによって発現されることを示す。約1歳の野生型(WT)及びmdx^{4Cv}(Mdx)の後肢筋肉から単離した衛星細胞(SC)、マクロファージ(MAC)及び線維性/脂肪原性前駆細胞(FAP)におけるC1qb発現のqPCR分析を示す。N=3。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****。

【図24C】C1qサブユニットが、ジストロフィーマウスの骨格筋内にマクロファージを浸潤させることによって発現されることを示す。約1歳の野生型(WT)及びmdx^{4Cv}(Mdx)マウスの後肢筋における1mg当たりの組織当たりのマクロファージの数を示す。N=3。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** ; $p \leq 0.0001$: ****。

【図25A】約1歳のC1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。約1歳のLy z Cre^{+/+} - C1qa^{FL/FL} ; mdx^{4Cv} (C1qa^{KO}) 及び Ly z Cre^{+/+} - C1qa^{WT/WT} ; mdx^{4Cv} (Cntr) のマウス体重(グラム)を示す。N=5 (C1qa^{KO})、N=7 (Cntr)、N=2 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図25B】約1歳のC1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図25A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験(HT)を示す。総ぶら下がり時間を評価した。N=5 (C1qa^{KO})、N=7 (Cntr)、N=2 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図25C】約1歳のC1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図25A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験(HT)を示す。マウス体重について正規化された総ぶら下がり時間を評価した。N=5 (C1qa^{KO})、N=7 (Cntr)、N=2 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図25D】約1歳のC1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図25A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド(OF)試験を示す。総距離(cm)を評価した。N=5 (C1qa^{KO})、N=7 (Cntr)、N=2 (WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

【図25E】約1歳のC1qa^{KO} ; mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。(図25A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド(OF)試験を示す。平均速度(cm/秒)を評価した。N=5 (C1qa^{KO})、N=7 (Cntr)

）、 $N = 2$ （WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

【図25F】約1歳のC1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。（図25A）のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド（OF）試験を示す。移動時間のパーセンテージを評価した。 $N = 5$ （C1qa^{KO}）、 $N = 7$ （Cntr）、 $N = 2$ （WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

【図25G】約1歳のC1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。（図25A）のように、マウスに対して行われた2つの脚のグリップ試験を示す。マウス体重に対して正規化された最大強度を評価した。 $N = 5$ （C1qa^{KO}）、 $N = 7$ （Cntr）、 $N = 2$ （WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

【図25H】約1歳のC1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。（図25A）のように、マウスに対して行われた2つの脚のグリップ試験を示す。マウス体重に対して正規化された総グリップ時間を評価した。 $N = 5$ （C1qa^{KO}）、 $N = 7$ （Cntr）、 $N = 2$ （WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

【図25I】約1歳のC1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。（図25A）のように、マウスで実施されたロータロッド試験を示す。マウス体重について正規化された総歩行時間を評価した。 $N = 5$ （C1qa^{KO}）、 $N = 7$ （Cntr）、 $N = 2$ （WT）。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ ：***及び $p \leq 0.0001$ ：****。

【図26】C1複合体成分の発現がジストロフィー性筋肉において増強したことを示す。C1複合体サブユニットC1qa、C1qb、C1qc、C1r、C1sのmRNA発現を、約1歳の野生型（WT）及びmdx^{4Cv}（MDX）マウス（ $N = 3$ ）の後肢筋肉で評価した。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対合t検定を適用した。 $p > 0.05$ ：ns； $p \leq 0.05$ ：*； $p \leq 0.01$ ：**； $p \leq 0.001$ 。

【図27】抗C1q、抗Axin2抗体、及びHoechstで染色した約1歳のmdx^{4Cv}の腓腹筋の代表的な免疫蛍光を示す。スケールバー（上部画像）：50 μ m、スケールバー（下部画像）：10 μ m。各領域におけるC1qとAxin2強度値との間の正の相関を示す。 $N = 3$ 。スピアマン係数： r 。

【発明を実施するための形態】

【0017】

概要

本開示は、広義には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（「DMD」）、ベッカー型筋ジストロフィー（「BMD」）、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）（サルコグリカノパチー、ジストログリカノパチー及びジスフェルリンパチーを含む）、VI型コラーゲン関連障害（ベスレム型ミオパチー及びウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー（UCMD）を含む）、先天性筋ジストロフィー（CMD）及び先天性ミオパチー、ならびに遠位性筋ジストロフィー／ミオパチー（三好型ミオパチーを含む）の予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法に関する。該方法は、C1複合体阻害剤、C1q阻害剤、C1s阻害剤、C1r阻害剤、またはC1複合体阻害剤（例えば、抗C1複合体抗体）等の古典的補体経路の阻害剤を対象に投与することを含む。阻害剤は、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエビジェネティック編集剤であり得る。核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、mi

10

20

30

40

50

R N A 阻害剤、m R N A、アプタマー、またはアンチセンス核酸であり得る。阻害剤は、標的生体分子の活性または発現を減少させることによるものかどうかにかかわらず、標的生体分子の生物学的機能を阻害する能力を有する化合物を指し得る。

【0018】

補体系は、D M D の進行中に筋線維に発生する壊死プロセスに関与し、代替の補体系経路は組織再生に直接関与する可能性がある。しかしながら、D M D の進行における古典的な補体経路の役割はあまり理解されておらず、今日まで筋肉再生へのその関与は知られていない。補体タンパク質の血清レベルの変化は、損なわれた骨格筋（すなわち、老化及び筋疾患）で報告されているが、骨格筋における補体成分の局所的な産生は、生理学的状態でも病理学的状態でも広範囲に調査されていない。

10

【0019】

W N T シグナル伝達の上昇は、再生過程において有害な役割を果たし、ジストロフィー性筋肉における線維化組織の蓄積を促進することが示されている。しかしながら、このプロセスに関与する分子及び細胞経路は、特徴解析が不十分である。先天性免疫におけるその役割に加えて、古典的な補体成分 C 1 q は、正準的な W N T シグナル伝達を活性化し得る。いくつかの実施形態では、開示される筋ジストロフィーを治療する方法は、部分的には、補体 C 1 q が D M D における W N T シグナル伝達経路の活性の増強と相関しているという発見に基づいている（図 27）。

【0020】

C 1 q - W n t 阻害は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのマウスモデルにおけるジストロフィー表現型をインビボで効果的に改善する。

20

【0021】

補体の C 1 複合体の R N A 及びタンパク質レベルは、早ければ生後 1 ヶ月で 10 倍増加し、健常な対照と比較して、ジストロフィー性 m d x ^{4 C v} 筋において 1 歳まで上昇したままである。本明細書の実施例に記載の研究で使用した抗 C 1 q ブロッキング抗体レジメンは、標的骨格筋（すなわち、横隔膜及び腓腹筋）における C 1 q 発現を効果的に阻害した。抗 C 1 q ブロッキング抗体で治療したジストロフィーマウスは、対照抗体で治療したジストロフィーマウスと比較して、疲労前の最大ぶら下がり時間が増加した。C 1 q a 遺伝的に除去されたジストロフィー性マウス（すなわち、C 1 q a ^{K O} ; m d x ^{4 C v}）において、約 1 ヶ月及び約 2 ヶ月齢で試験した対照と比較して、疲労前の最大ぶら下がり時間の改善を示唆する同様の傾向が観察された。この改善は、1 ヶ月後には明らかではなく、C 1 q の遺伝的焼灼によって及ぼされる可能性のある一過性の効果を示唆している。1 歳の C 1 q a ^{K O} ; m d x ^{4 C v} は、対照と比較してグリップ試験を実施することにより多くの時間に抵抗し、対照と比較して疲労前の最大ぶら下がり時間の増加に向かう、傾向を示した。全体として、正準 W N T 標的遺伝子及び線維原性遺伝子の遺伝子発現は、C 1 q a ^{K O} ; m d x ^{4 C v} マウスにおいても低下しなかった。対照と比較した C 1 q a ^{K O} ; m d x ^{4 C v} 血清におけるクレアチンキナーゼ（C K）活性の低下を示唆する傾向が観察された。しかしながら、対照と比較して、抗 C 1 q 抗体で治療したジストロフィー性マウスにおいて、C K 活性レベルの差は観察されなかった。

30

40

【0022】

第 1 に、補体レベル、具体的には古典的補体経路の構成要素の発現を、ジストロフィー性及び野生型マウスの筋肉において評価し、補体タンパク質レベルは、健康な対照と比較して、早ければ生後 1 ヶ月で増加し、ジストロフィー性 m d x ^{4 C v} 筋において 1 歳まで上昇したままであることが見出された。

【0023】

抗 C 1 q ブロッキング抗体で治療したジストロフィー性マウスから採取した組織（すなわち、横隔膜、腓腹筋及び肝臓）で実施した E L I S A 分析は、採用したレジメンが、C 1 q の発現を、C 1 q a 遺伝的に除去したマウス組織（すなわち、C 1 q a ^{K O} ; m d x ^{4 C v}）における C 1 q レベルと同様のレベルまで強く低下させたことを示した。したが

50

って、P a x 7 C r e E R ; R 2 6 R Y F P ; m d x 4 C v マウスを、10週齢で始まる抗C1qブロッキング抗体で2週間、100mg/kgの投薬量で2回/週のレジメンで腹腔内(i.p.)で治療することは、C1q骨格筋及び肝臓発現を枯渇させる効果的な方法である。

【0024】

抗C1qブロッキング抗体レジメンが、ジストロフィー性骨格筋におけるC1q発現を効果的に枯渇させたと評価した後、本発明者らは、マウスの機能パラメータ、正準WNT標的遺伝子及び線維原性関連遺伝子の遺伝子発現、ならびにクレアチンキナーゼ活性レベルに対するC1q枯渇の効果を評価した。

【0025】

約1ヶ月齢及び約2ヶ月齢の両方で、4肢ハンギングワイヤー試験において、対照と比較してC1q a^{KO}; m d x 4 C v マウスで身体活動の改善を観察した。しかしながら、この傾向は一過性にしか現れず、マウスを生後約3ヶ月で試験したときにはもはや観察されなかった。抗C1q抗体で処理したジストロフィー性マウスは、4肢ハンギングワイヤー試験で対照抗体で処理したマウスと比較して、高い身体的活動を生じさせた。

【0026】

定義

本明細書で使用される場合、「a」または「an」は、1つ以上を意味し得る。本明細書において請求項(複数可)で使用される場合、用語「含む」と併せて使用される場合、用語「a」または「an」は、1つまたは複数を意味し得る。例えば、「抗体」に対する言及は、1つから多くの抗体の言及である。本明細書で使用される場合、「別の」は、少なくとも第2のまたはそれ以上を意味し得る。

【0027】

本明細書で使用される場合、別の化合物または組成物と「併せた」投与は、同時投与及び/または異なる時点での投与を含む。併せた投与はまた、異なる投薬頻度または間隔、及び同じ投与経路または異なる投与経路を使用することを含む、共製剤としての投与または別々の組成物としての投与を包含する。

【0028】

用語「免疫グロブリン」(Ig)は、本明細書で「抗体」と互換的に使用される。本明細書における用語「抗体」は、最も広義に使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、生物学的活性を示す場合に限り抗体断片、及び抗体誘導体を具体的に包含する。

【0029】

「単離された」分子または細胞は、それが生成された環境において通常関連する少なくとも1つの混入分子または細胞から同定及び分離された分子または細胞である。好ましくは、単離された分子または細胞は、生成環境に関連する全ての成分と会合しない。単離された分子または細胞は、天然に見られる形態または状況以外の形態である。そのため、単離された分子は、細胞に天然に存在する分子とは区別され; 単離された細胞は、組織、器官、または個体に天然に存在する細胞とは区別される。いくつかの実施形態では、単離された分子は、本開示の抗C1s、抗C1q、または抗C1r抗体である。他の実施形態では、単離された細胞は、本開示の抗C1s、抗C1q、または抗C1r抗体を生成する宿主細胞またはハイブリドーマ細胞である。

【0030】

「単離された」抗体は、その生成環境(例えば、天然または組換え)の成分から同定、分離、及び/または回収されたものである。好ましくは、単離されたポリペプチドは、その生成環境からの全ての他の混入成分と会合しない。組換えトランスフェクション細胞に起因するものなどのその生成環境からの混入成分は、抗体の研究、診断的または治療的使用を典型的に妨げるであろう物質であり、これには酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質が含まれ得る。ある特定の好ましい実施形態では、ポリペ

10

20

30

40

50

プチドは、(1)例えば、ローリー法によって決定される、抗体の95重量%超、いくつかの実施形態では、99重量%超になるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用して、N末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度まで、または(3)クマシーブルー、または好ましくはシルバー染色を使用して、非還元または還元条件下でSDS-PAGEによって均質性が得られるまで、精製されるであろう。単離された抗体には、抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換えT細胞内で*in situ*の抗体が含まれる。しかしながら、通常、単離されたポリペプチドまたは抗体は、少なくとも1つの精製工程を含むプロセスによって調製される。

【0031】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ「V_H」及び「V_L」と称され得る。これらのドメインは通常、抗体の最も可変性の高い部分であり（同じクラスの他の抗体と比べて）、抗原結合部位を含有する。

【0032】

用語「可変」は、可変ドメインのある特定のセグメントが、抗体によって配列が大幅に異なるという事実を指す。Vドメインは、抗原結合を媒介し、特定の抗体の、その特定の抗原に対する特異性を定義する。しかしながら、可変性は、可変ドメイン全体に均等に分布しているわけではない。むしろ、それは、軽鎖及び重鎖の両方の可変ドメインの両方において、超可変領域(HVR)と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、ベーターシート構造を接続し、いくつかの場合では、ベーターシート構造の一部を形成するループを形成する3つのHVRによって接続されたベーターシート立体配置を大いに採用する4つのFR領域を含む。各鎖内のHVRは、FR領域によって近接して互いに結び付いており、他方の鎖のHVRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)を参照されたい)。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合に直接的に関与しないが、様々なエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与を示す。

【0033】

本明細書で使用される場合、用語「CDR」または「相補性決定領域」は、重鎖及び軽鎖の両方のポリペプチドの可変領域内に見られる非連続的抗原結合部位を意味することが意図されている。CDRは、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977)、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991) (本明細書ではKabat 1991とも称される)、Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) (本明細書ではChothia 1987とも称される)、及びMacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) (定義には、互いに対して比較した場合にアミノ酸残基の重複またはサブセットが含まれる)に記載されている。それにもかかわらず、抗体もしくはグラフト抗体またはそのバリエーションのCDRを指すためのいずれの定義の適用も、本明細書で定義及び使用される用語の範囲内であることが意図されている。

【0034】

本明細書で使用される場合、用語「CDR-L1」、「CDR-L2」、及び「CDR-L3」は、それぞれ、軽鎖可変領域における第1、第2、及び第3CDRを指す。本明細書で使用される場合、用語「CDR-H1」、「CDR-H2」、及び「CDR-H3」は、それぞれ、重鎖可変領域における第1、第2、及び第3CDRを指す。本明細書で

使用される場合、用語「CDR-1」、「CDR-2」、及び「CDR-3」は、それぞれ、いずれかの鎖の可変領域の第1、第2及び第3CDRを指す。

【0035】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用される場合、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団の個々の抗体は、微量で存在し得る天然に存在する突然変異及び／または翻訳後修飾（例えば、異性体化、アミド化）を除き、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して仕向けられている。異なる決定基（エピトープ）に対して仕向けられた異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して仕向けられている。それらの特異性に加え、モノクローナル抗体は、典型的にはハイブリドーマ培養によって合成され、他の免疫グロブリンが混入されていないので有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団として得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本開示に従って使用されるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975)、Hongo et al., *Hybridoma*, 14(3):253-260 (1995)、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988)、Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）、ファージディスプレイ技術（例えば、Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)、Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992)、Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004)、Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004)、Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101(34):12467-472 (2004)、及びLee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004))、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座もしくはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部もしくは全てを有する動物においてヒトまたはヒト様抗体を産生するための技術（例えば、WO1998/24893、WO1996/34096、WO1996/33735、WO1991/10741、Jakobovits et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993)、Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993)、Bruggemann et al. *Year in Immunol.* 7:33 (1993)、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、及び同第5,661,016号、Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)、Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994)、Morrison, *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996)、Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996)、ならびにLonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)を参照されたい)を含む様々な技術によって生成され得る。

【0036】

「全長抗体」は通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖を含む約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されている一方で、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫

10

20

30

40

50

グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖及び軽鎖は、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン (V_H) と、それに続くいくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン (V_L) を有し、その他端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。用語「全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「完全抗体」は、抗体断片または抗体誘導体とは対照的に、実質的にインタクトな形態の抗体を指すために互換的に使用される。具体的には、完全抗体は、Fc領域を含む重鎖及び軽鎖を有するものを含む。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン (例えば、ヒト天然配列定常ドメイン) またはそのアミノ酸配列バリエーションであり得る。いくつかの場合では、インタクトな抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有し得る。

10

【0037】

抗体の「抗体断片」または「抗原結合断片」または「機能的断片」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合及び／または可変領域または改変されたFcR結合能力を保持するまたは有する抗体のFc領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 及びFv断片；ダイアボディ；及び線状抗体が含まれる (米国特許第5,641,870号、実施例2；Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)を参照されたい)。抗体断片の追加の例には、抗体誘導体、例えば、抗体断片から形成される一本鎖抗体分子、一価抗体及び多重特異性抗体が含まれる。

20

【0038】

「抗体誘導体」は、抗体の抗原結合領域を含む任意のコンストラクトである。抗体誘導体の例には、抗体断片から形成される一本鎖抗体分子、一価抗体及び多重特異性抗体が含まれる。

【0039】

抗体のパイン消化により、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して表記される1つの残留「Fc」断片とが生成される。Fabフラグメントは、L鎖全体に加えて、H鎖の可変領域ドメイン (V_H)、ならびに1つの重鎖の第1の定常ドメイン (C_{H1}) からなる。各Fabフラグメントは、抗原結合に関しては一価である、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、単一の大型 $F(ab')_2$ 断片をもたらす、これは、異なる抗原結合活性を有する2つのジスルフィド結合したFab断片にほぼ対応し、依然として抗原を架橋することができる。Fab'断片は、 C_{H1} ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む、いくつかの更なる残基を有することにより、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基 (複数可) が遊離チオール基を持つFab'の本明細書における呼称である。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、元来、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生成された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも既知である。

30

【0040】

Fcフラグメントは、ジスルフィドによって一緒に保持された両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域における配列によって決定され、この領域はまた、ある特定の細胞型に見られるFc受容体 (FcR) によって認識される。

40

【0041】

本明細書における「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用され、天然配列のFc領域及びバリエーションFc領域が含まれる。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は様々であり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、Cys226位のアミノ酸残基から、またはPro230から、そのカルボキシル末端まで伸びると定義される。Fc領域のC末端リジン (EU番号付けシステムによると残基447

50

）は、例えば、抗体の生成もしくは精製の間に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組換え操作することによって、除去されてもよい。したがって、インタクトな抗体の組成物は、全K447残基が除去された抗体母集団、除去されたK447残基がない抗体母集団、及びK447残基を有する抗体と有しない抗体との混合物を有する抗体母集団を含んでもよい。本開示の抗体における使用に好適な天然配列のFc領域には、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4が含まれる。

【0042】

「天然配列Fc領域」は、天然で見られるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトFc領域には、天然配列ヒトIgG1 Fc領域（非A及びAアロタイプ）、天然配列ヒトIgG2 Fc領域、天然配列ヒトIgG3 Fc領域、及び天然配列ヒトIgG4 Fc領域、ならびにそれらの天然に存在するバリエーションが含まれる。

10

【0043】

「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸改変、好ましくは1つ以上のアミノ酸置換（複数可）によって天然配列Fc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、バリエーションFc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列Fc領域中または親ポリペプチドのFc領域中に約1～約10個のアミノ酸置換、及び好ましくは約1～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書におけるバリエーションFc領域は、好ましくは、天然配列Fc領域及び／または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の同一性、ならびに最も好ましくは、それらと少なくとも約90%の同一性、より好ましくは、それらと少なくとも約95%の同一性を保有する。

20

【0044】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を表す。好ましいFcRは、天然配列ヒトFcRである。更に、好ましいFcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）と結合し、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIサブクラスを受容体を含み、これらの受容体の対立遺伝子バリエーション及び選択的スプライシング形態を含むものであり、FcγRII受容体には、FcγRIIA（「活性化受容体」）及びFcγRIIB（「阻害受容体」）が含まれ、これらは主にその細胞質性ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（「ITAM」）を含む。阻害受容体FcγRIIBは、免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（「ITIM」）をその細胞質性ドメインに含有する。（例えば、M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)を参照されたい）。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)、Capellet al., Immunomethods 4: 25-34 (1994)、及びde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)において検討されている。将来特定されるものを含む他のFcRは、本明細書における「FcR」という用語に包含される。FcRは、抗体の血清半減期を増加させ得る。

30

40

【0045】

ヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドのインビボでのFcRnへの結合及び血清中半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウスもしくはトランスフェクトヒト細胞株において、またはバリエーションFc領域を有するポリペプチドが投与される霊長類においてアッセイすることができる。WO2004/42072 (Presta)は、FcRへの結合が改善または低減された抗体バリエーションについて記載している。また、例えば、Shields et al., J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001)を参照されたい。

【0046】

「Fv」は、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を含有する最小の抗体フラグメント

50

である。このフラグメントは、1つの重鎖可変領域ドメインと1つの軽鎖可変領域ドメインが、非共有結合で緊密に結合した二量体からなる。これらの2つのドメインの折り畳みにより、抗原結合のためのアミノ酸残基を提供し、抗原結合特異性を抗体に与える、6つの超可変ループ（H鎖及びL鎖からそれぞれ3つのループ）が生じる。しかしながら、全結合部位よりも低い親和性であるが、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的なHVRを3つしか含まないFvの半分）でさえも、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

【0047】

「sFv」または「scFv」とも短縮される「一本鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖に結合されるV_H及びV_L抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sFvポリペプチドは、V_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含んでおり、sFvが抗原結合に所望される構造を形成することを可能にする。sFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

【0048】

「ダイアボディ」という用語は、鎖内ではなく鎖間のVドメイン対合を達成し、それによって二価フラグメント、すなわち、2つの抗原結合部位を有するフラグメントが得られるように、V_HドメインとV_Lドメインとの間に短いリンカー（約5～10個の残基）を用いてsFvフラグメント（前の段落を参照されたい）を構築することによって調製された小さな抗体フラグメントを指す。二重特異性ダイアボディは、2つの抗体のV_H及びV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖に存在している、2つの「交差」sFvフラグメントのヘテロ二量体である。ダイアボディは、例えば、EP404,097、WO1993/011161、WO/2009/121948、WO/2014/191493、Hollinger et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993)においてより詳細に記載されている。

【0049】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗体」は、重鎖及び／または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体内の対応する配列と同一または相同である一方で、鎖（複数可）の残りが、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である抗体（免疫グロブリン）、ならびにそのような抗体の断片を指し、これは、それらが所望される生物学的活性を呈する限りにおいてである（米国特許第4,816,567号、Morrison et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984)）。本明細書における対象となるキメラ抗体には、PRIMATIZED（登録商標）抗体が含まれ、ここで、この抗体の抗原結合領域は、例えば、マカクザルに目的の抗原で免疫付与を行うことによって生成される抗体に由来する。本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」は、「キメラ抗体」のサブセットである。

【0050】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、レシピエントのHVRからの残基が、所望される特異性、親和性、及び／または能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）のHVRからの残基で置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基に置き換えられる。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含み得る。これらの改変は、結合親和性などの抗体の性能を更に改良するために行われ得る。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むこと

になり、ここで、超可変ループの全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリン配列のものに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものであるが、FR領域には、結合親和性、異性体化、免疫原性などの抗体の性能を向上させる1つ以上の個々のFR残基置換が含まれてもよい。FRにおけるこれらのアミノ酸置換の数は典型的には、H鎖では6以下、及びL鎖では3以下である。ヒト化抗体はまた、任意に、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含む。更なる詳細については、例えば、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)、及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。また、例えば、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)、Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)、Hurler and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)、ならびに米国特許第6,982,321号及び第7,087,409号を参照されたい。

10

【0051】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生成された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体、及び／または本明細書に開示されるヒト抗体を作製する技術のうちの任意のものを用いて作製されたものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む当該技術分野で既知の種々の技術を使用して生成され得る。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)に記載の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。また、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001)を参照されたい。ヒト抗体は、抗原攻撃に応答してそのような抗体を生成するように改変されているが、その内因性遺伝子座が無効化されているトランスジェニック動物、例えば、免疫化異種マウス(xenomice)に抗原を投与することにより調製され得る(例えば、XENOMOUSE(商標)技術に関しては、米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号を参照されたい)。例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体についても、Li et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)を参照されたい。

20

30

【0052】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」、「HVR」、または「HV」という用語は、配列が超可変性であり、及び／または構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。概して、抗体は、6つのHVRを含み、3つがVHにあり(H1、H2、H3)、3つがVLにある(L1、L2、L3)。天然抗体において、H3及びL3は、これらの6つのHVRのうちで最も高い多様性を呈し、特にH3が、抗体に優れた特異性を与える上で特有の役割を果たすと考えられている。例えば、Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000)、Johnson and Wu in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)を参照されたい。実際には、重鎖のみからなる天然に存在するラクダ科抗体は、軽鎖の不在下で機能的であり、安定している。例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)及びSheriff et al.

40

50

., Nature Struct. Biol. 3: 733-736 (1996) を参照されたい。

【0053】

いくつかのHVR描写が本明細書で使用され、本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域(CDR)であるHVRは、配列可変性に基づくものであり、最も一般的に使用されている(上記のKabat et al.)。Chothiaは、そうではなく、構造的ループの位置を指す(Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。AbM HVRは、Kabat CDRとChothia構造的ループとの間の妥協案を示し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらのHVRの各々由来の残基が以下に記載される。

10

【表1】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B(Kabat 番号付け)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35(Chothia 番号付け)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

20

【0054】

HVRは、以下のように「伸長HVR」を含み得る：VLにおける24~36または24~34(L1)、46~56または50~56(L2)、及び89~97または89~96(L3)、ならびにVHにおける26~35(H1)、50~65または49~65(好ましい実施形態)(H2)、及び93~102、94~102、または95~102(H3)。可変ドメイン残基は、これらの伸長HVRの定義の各々について上記のKabat et al. に従って番号付けされる。

30

【0055】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書に定義されるHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0056】

「Kabatにあるような可変ドメイン残基番号付け」または「Kabatにあるようなアミノ酸位置番号付け」という語句、及びそれらの変形は、上記のKabat et al. における抗体の編集物の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用される番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを使用して、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはHVRの短縮、またはそれへの挿入に対応するより少ないアミノ酸または追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52後に単一のアミノ酸挿入(Kabatに従って残基52a)を、また重鎖FR残基82後に挿入された残基(例えば、Kabatに従って残基82a、82b、及び82c等)を含んでもよい。残基のKabat番号付けは、所与の抗体に対して、抗体の配列と「標準の」Kabatによって番号付けされた配列との相同領域での整合によって決定され得る。

40

【0057】

Kabatナンバリングシステムは、一般に、可変ドメイン内の残基(大体、軽鎖の1~107残基及び重鎖の1~113残基)に言及する際に使用される(例えば、Kaba

50

t et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 「EU番号付けシステム」または「EU指標」は、一般に、免疫グロブリン重鎖定常領域内の残基に言及する際に使用される（例えば、上記の Kabat et al. で報告されている EU 指標）。「Kabatにあるような EU 指標」は、ヒト IgG1 EU 抗体の残基番号付けを指す。本明細書に別途述べられない限り、抗体の可変ドメインにおける残基番号への言及は、Kabat 番号付けシステムによる残基番号付けを意味する。本明細書で別途述べられない限り、抗体の定常ドメインにおける残基番号への言及は、EU 番号付けシステムによる残基番号付けを意味する（例えば、米国特許公開第 2010-280227 号を参照されたい）。

10

【0058】

指定された位置における「アミノ酸改変」は、指定された残基の置換もしくは欠失、または指定された残基に隣接する少なくとも 1 個のアミノ酸残基の挿入を指す。指定された残基に「隣接する」挿入は、その 1～2 個の残基内への挿入を意味する。挿入は、指定された残基の N 末端側または C 末端側であり得る。本明細書における好ましいアミノ酸改変は、置換である。

【0059】

「親和性成熟」抗体は、その 1 つ以上の HVR に 1 つ以上の変化を有し、これらの変化が、それらの変化（複数可）を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性の向上をもたらすものである。いくつかの実施形態では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対するナノモルまたは更にはピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当該技術分野で公知の手順によって生成される。例えば、Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992) は、VH 及び VL ドメインシャッフリングによる親和性成熟について記載している。HVR 及び／またはフレームワーク残基のランダム変異誘発は、例えば、Barbas et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)、Schier et al. Gene 169:147-155 (1995)、Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)、Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)、及び Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992) に記載されている。

20

30

【0060】

本明細書で使用される場合、用語「特異的に認識する」または「特異的に結合する」は、生物学的分子を含む分子の異種集団の存在下で標的の存在を決定する、標的と抗体との間の引力または結合などの測定可能な及び再生可能な相互作用を指す。例えば、標的またはエピトープに特異的または優先的に結合する抗体は、他の標的または標的の他のエピトープに結合する場合よりも高い親和性、アビディティで、より容易に、及び／またはより長い持続時間でこの標的またはエピトープに結合する抗体である。例えば、第 1 の標的に特異的または優先的に結合する抗体（または部位）は、第 2 の標的に特異的または優先的に結合する場合があり、または結合しない場合があることも理解される。このように、「特異的結合」または「優先的結合」は、排他的な結合を（含み得るが）必ずしも必要とするわけではない。標的に特異的に結合する抗体は、少なくとも約 10^3 M^{-1} または 10^4 M^{-1} 、時に約 10^5 M^{-1} または 10^6 M^{-1} 、他の例では約 10^6 M^{-1} または 10^7 M^{-1} 、約 10^8 M^{-1} ～ 10^9 M^{-1} 、または約 10^{10} M^{-1} ～ 10^{11} M^{-1} またはそれ以上の結合定数を有し得る。特定のタンパク質と特異的免疫反応性の抗体を選択するために多様なイムノアッセイ形式が使用され得る。例えば、固相 ELISA イムノアッセイは、タンパク質と特異的免疫反応性のモノクローナル抗体を選択するために日常的に使用される。特異的免疫反応性を決定するために使用され得るイムノアッセイ形式及び条件の説明については、例えば、Harlow and Lane (1988) Anti bo

40

50

dies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照されたい。

【0061】

「同一性」は、本明細書で使用される場合、アライメントされた配列における任意の特定の位置でアミノ酸残基が配列間で同一であることを示す。「類似性」は、本明細書で使用される場合、アライメントされた配列における任意の特定の位置でアミノ酸残基が配列間で類似するタイプのものであることを示す。例えば、ロイシンは、イソロイシンまたはバリンの代わりに用いられ得る。しばしば互いに置換され得る他のアミノ酸には、以下が含まれるがこれらに限定されない：

- －フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）；
- －リジン、アルギニン及びヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；
- －アスパルテート及びグルタメート（酸性側鎖を有するアミノ酸）；
- －アスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）；及び
- －システイン及びメチオニン（硫黄含有側鎖を有するアミノ酸）

10

【0062】

同一性及び類似性の度合いは、容易に計算できる。（例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988、Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993、Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994、Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987、及びSequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991を参照されたい）。

20

【0063】

本明細書で使用される場合、補体タンパク質と第2のタンパク質との間の「相互作用」は、限定されないが、タンパク質－タンパク質相互作用、物理的相互作用、化学的相互作用、結合、共有結合、及びイオン結合を包含する。本明細書で使用される場合、抗体が2つのタンパク質間の相互作用を破壊し、減少させ、または完全に排除する場合、抗体は、2つのタンパク質間の「相互作用を阻害する」。抗体またはその断片が2つのタンパク質のうちの1つに結合する場合、本開示の抗体、またはその断片は、2つのタンパク質間の「相互作用を阻害する」。

30

【0064】

「遮断」抗体、「アンタゴニスト」抗体、「阻害」抗体、または「中和」抗体は、それが結合する抗原の1つ以上の生物学的活性、例えば、1つ以上のタンパク質との相互作用を阻害または減少させる抗体である。いくつかの実施形態では、遮断抗体、アンタゴニスト抗体、阻害抗体、または「中和」抗体は、抗原の1つ以上の生物学的活性または相互作用を実質的にまたは完全に阻害する。

40

【0065】

用語「阻害剤」は、標的生体分子の活性または発現を減少させることによるものかどうかにかかわらず、標的生体分子、例えば、mRNAまたはタンパク質の生物学的機能を阻害する能力を有する化合物を指す。阻害剤は、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエビジェネティック編集剤であり得る。核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸であり得る。用語「アンタゴニスト」は、受容体に結合し、受容体の生物学的反応を阻止または減衰させる化合物を指す。用語「阻害剤」はまた、「アンタゴニスト」を指し得る。

50

【0066】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（天然配列Fc領域またはアミノ酸配列バリエーションFc領域）に起因するそれらの生物学的活性を指し、抗体アイソタイプによって異なる。

【0067】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、2つの物質（例えば、抗体及び抗原）の可逆的結合についての平衡定数を指し、解離定数（KD）として表される。親和性は、非関連アミノ酸配列に対する抗体の親和性よりも少なくとも1倍高く、少なくとも2倍高く、少なくとも3倍高く、少なくとも4倍高く、少なくとも5倍高く、少なくとも6倍高く、少なくとも7倍高く、少なくとも8倍高く、少なくとも9倍高く、少なくとも10倍高く、少なくとも20倍高く、少なくとも30倍高く、少なくとも40倍高く、少なくとも50倍高く、少なくとも60倍高く、少なくとも70倍高く、少なくとも80倍高く、少なくとも90倍高く、少なくとも100倍高く、または少なくとも1,000倍高く、またはそれ以上であり得る。標的タンパク質に対する抗体の親和性は、例えば、約100ナノモル濃度（nM）～約0.1nM、約100nM～約1ピコモル濃度（pM）、または約100nM～約1フェムトモル濃度（fM）またはそれ以上であり得る。本明細書で使用される場合、用語「アビディティ」は、2つ以上の物質の複合体が希釈後に解離することに対する抵抗性を指す。用語「免疫反応性」及び「優先的に結合する」は、抗体及び／または抗原結合断片に関して本明細書で互換的に使用される。

【0068】

用語「結合」は、例えば、塩架橋及び水架橋などの相互作用を含む、共有結合性、静電気性、疎水性、及びイオン性及び／または水素結合相互作用による、2つの分子間の直接的会合を指す。例えば、対象抗C1s抗体は、補体C1sタンパク質内のエピトープに特異的に結合する。「特異的結合」は、少なくとも約 10^{-7} M以上、例えば、 5×10^{-7} M、 10^{-8} M、 5×10^{-8} M、及びそれ以上の親和性での結合を指す。「非特異的結合」は、約 10^{-7} M未満の親和性、例えば、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M等の親和性での結合を指す。

【0069】

用語「kon」は、本明細書で使用される場合、抗原に対する抗体の会合についての速度定数を指すことが意図されている。

【0070】

用語「koff」は、本明細書で使用される場合、抗体／抗原複合体からの抗体の解離についての速度定数を指すことが意図されている。

【0071】

用語「KD」は、本明細書で使用される場合、抗体－抗原相互作用の平衡解離定数を指すことが意図されている。

【0072】

本明細書で使用される場合、ペプチド、ポリペプチド、または抗体配列に関して、「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」及び「相同性」は、配列同一性最大パーセントを達成するために、配列を整合させ、必要に応じてギャップを導入した後の、配列同一性の一部としていずれの保存的置換も考慮しない、特定のペプチドもしくはポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合を指す。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、例えば、公共に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMEGALIGN（商標）（DNASTAR）ソフトウェアを使用して、当該技術分野における技術内の様々な方法で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するのに必要な当該技術分野で知られている任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定し得る。

【0073】

「生物学的サンプル」は、個体から得られる多様なサンプルタイプを包含し、診断また

はモニタリングアッセイにおいて使用され得る。その定義は、血液及び生物学的起源の他の液体サンプル、固体組織サンプル、例えば、生検試料または組織培養物またはそれに由来する細胞及びその子孫を包含する。その定義にはまた、それらの調達後に任意の方法で、例えば、ポリヌクレオチドなどのある特定の成分について試薬での処置、可溶化、または濃縮によって操作されたサンプルが含まれる。用語「生物学的サンプル」は、臨床サンプルを包含し、培養細胞、細胞上清、細胞ライセート、血清、血漿、生体液、及び組織サンプルも含む。用語「生物学的サンプル」には、尿、唾液、脳脊髄液、間質液、眼液、滑液、血液分画、例えば、血漿及び血清などが含まれる。用語「生物学的サンプル」にはまた、固体組織サンプル、組織培養サンプル、及び細胞サンプルが含まれる。

【0074】

「単離された」核酸分子は、それが生成された環境において通常関連する少なくとも1つの混入核酸分子から同定及び分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸は、生成環境に関連する全ての成分と会合しない。本明細書におけるポリペプチド及び抗体をコードする単離された核酸分子は、天然に見られる形態または状況以外の形態である。そのため、単離された核酸分子は、細胞において天然に存在する本明細書における任意のポリペプチド及び抗体をコードする核酸とは区別される。

【0075】

用語「ベクター」は、本明細書で使用される場合は、それが連結された別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指すことが意図されている。ベクターの1つのタイプは、「プラスミド」であり、これは、追加のDNAセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖DNAを指す。ベクターの別のタイプは、ファージベクターである。ベクターの別のタイプは、ウイルスベクターであり、この場合、追加のDNAセグメントがウイルスゲノム内にライゲーションされ得る。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製が可能である（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入すると宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、それにより宿主ゲノムとともに複製される。更に、ある特定のベクターは、それらが機能可能に連結された遺伝子の発現を指示することが可能である。そのようなベクターは、本明細書で「組換え発現ベクター」、または単純に「発現ベクター」と称される。通常、組換えDNA技術において有用な発現ベクターはしばしば、プラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に使用される形態のベクターであるため互換的に使用され得る。

【0076】

本明細書で互換的に使用される「ポリヌクレオチド」、または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、改変ヌクレオチドまたは塩基、及び／またはそれらのアナログ、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼによってまたは合成反応によってポリマーに組み込まれ得る任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチド及びそれらのアナログを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する改変は、ポリマーのアセンブリの前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって隔てられていてもよい。ポリヌクレオチドは、合成後に生成される改変（複数可）、例えば、標識へのコンジュゲーションを含み得る。他のタイプの改変には、例えば、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つ以上をアナログと置換する「キャップ」、ヌクレオチド間改変、例えば、非電荷性結合（例えば、メチルホスホン酸塩、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど）によるもの、及び電荷性結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）によるもの、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリーレーリジンなど）などの懸垂部位を含むもの、挿入剤（例えば、アクリジン、ソラーレンなど）によるもの、キレート剤（例えば、金属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属など）を含むもの、アルキル化剤を含むもの、改変結合（例えば、アルファアノ

10

20

30

40

50

マー核酸など)によるもの、ならびにポリヌクレオチド(複数可)の未改変形態が含まれる。更に、糖内に通常存在するヒドロキシル基のうちのいずれかは、例えば、ホスホン酸基、リン酸基により置き換えられるか、標準的な保護基により保護されるか、もしくは活性化されて追加のヌクレオチドへの追加の結合を生成してもよく、または固体もしくは半固体支持体にコンジュゲーションされてもよい。5'及び3'末端OHは、リン酸化され、またはアミンもしくは1~20個の炭素原子の有機キャッピング基部位と置換され得る。他のヒドロキシルもまた、標準的な保護基に誘導体化され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-フルオロまたは2'-アジド-リボース、炭素環糖アナログ、 α -アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロースまたはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、アクリル酸アナログ、及び塩基性ヌクレオシドアナログ、例えば、メチルリボシドを含む、当該技術分野において一般的に知られているリボースまたはデオキシリボース糖のアナログ形態を含み得る。1つ以上のホスホジエステル結合は、代替連結基によって置き換えられ得る。これらの代替連結基には、ホスフェートがP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO、またはCH₂(「ホルムアセタール」)(式中、各RまたはR'は、独立して、H、またはエーテル(-O-)結合を任意に含有する置換もしくは非置換アルキル(1~20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラルキルである)によって置き換えられた実施形態が含まれるがこれらに限定されない。ポリヌクレオチドにおける全ての結合が同一である必要はない。先述の記載は、RNA及びDNAを含む、本明細書で言及される全てのポリヌクレオチドに適用される。

10

20

【0077】

本明細書で使用される「担体」には、用いられる投薬量及び濃度でそれに曝露されている細胞または哺乳動物に対して非毒性の薬学的に許容可能な担体、賦形剤、または安定化剤が含まれる。しばしば、生理的に許容可能な担体は、水性pH緩衝液である。生理的に許容可能な担体の例には、緩衝液、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む単糖、二糖、及び他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；及び／または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN(商標)、ポリエチレングリコール(PEG)及びPLURONICS(商標)が含まれる。

30

【0078】

「遺伝子編集剤」は、本明細書で使用される場合、その代表例として、Cas9及びCpf1gRNA等のCRISPR関連ヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼのArgonauteファミリー、クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文反復(CRISPR)ヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、他のエンドヌクレアーゼ及び／またはエキソヌクレアーゼが挙げられる、遺伝子編集剤として定義される。Schiffrer, 2012, J Virol 88(17): 8920-8936(参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

40

【0079】

本明細書で使用される「RNA干渉剤」は、RNA干渉(RNAi)によって標的バイオマーカー遺伝子の発現を妨害または阻害する任意の薬剤として定義される。そのようなRNA干渉剤には、本発明の標的バイオマーカー遺伝子に相同なRNA分子またはその断片、小分子干渉RNA(siRNA)、及びRNA干渉(RNAi)による標的バイオマーカー核酸の発現を妨げるかまたは阻害する小分子を含む核酸分子が含まれるが、これらに限定されない。

50

【0080】

「RNA干渉(RNAi)」は、標的バイオマーカー核酸と同一もしくは非常に類似の配列のRNAの発現または導入が、その標的遺伝子から転写されたメッセンジャーRNA(mRNA)の配列特異的分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)(Coburn, G. and Cullen, B. (2002) J. of Virology 76(18):9225を参照されたい)をもたらし、それによって標的バイオマーカー核酸の発現を阻害する、進化的に保存されたプロセスである。一実施形態では、RNAは、二本鎖RNA(dsRNA)である。このプロセスは、植物、無脊椎動物、及び哺乳動物細胞に記載されている。自然界では、RNAiは、dsRNA特異的エンドヌクレアーゼDicerによって開始され、これは、siRNAと呼ばれる二本鎖断片への長いdsRNAのプロセッシブな切断を促進する。siRNAは、標的mRNAを認識し、切断するタンパク質複合体に組み込まれる。RNAiはまた、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害するかまたはサイレンシングするために、核酸分子、例えば、合成siRNA、shRNA、または他のRNA干渉剤を導入することによって開始され得る。本明細書で使用される場合、「標的バイオマーカー核酸発現の阻害」または「マーカー遺伝子発現の阻害」は、標的バイオマーカー核酸によってコードされる標的バイオマーカー核酸もしくはタンパク質の発現またはタンパク質活性またはレベルのいずれかの減少を含む。減少は、標的バイオマーカー核酸の発現、またはRNA干渉剤によって標的化されていない標的バイオマーカー核酸によってコードされるタンパク質の活性もしくはレベルと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%以上であってよい。

10

20

【0081】

RNAiに加えて、ゲノム編集は、C1q、C1r、及び／またはC1s等の補体経路成分等の、対象となるバイオマーカーの構成的または誘発されるノックアウトまたは突然変異等の、対象となるバイオマーカーのコピー数または遺伝子配列を調節するために使用され得る。例えば、CRISPR-Cas系は、ゲノム核酸の正確な編集のために(例えば、非機能的またはヌル変異を作製するために)使用され得る。そのような実施形態では、CRISPRガイドRNA及び／またはCas酵素が、発現されてもよい。例えば、ガイドRNAのみを含有するベクターは、Cas9酵素トランスジェニック動物または細胞に投与することができる。同様の戦略が使用され得る(例えば、デザイナー亜鉛フィンガー、転写活性化因子様エフェクター(TALE)またはホーミングメガヌクレアーゼ)。そのようなシステムは、当該技術分野において周知である(例えば、米国特許第8,697,359号、Sander and Joung (2014) Nat. Biotech. 32:347-355、Hale et al. (2009) Cell 139:945-956、Karginov and Hannon (2010) Mol. Cell 37:7、米国特許公開第2014/0087426号及び同第2012/0178169号、Boch et al. (2011) Nat. Biotech. 29:135-136、Boch et al. (2009) Science 326:1509-1512、Moscou and Bogdanove (2009) Science 326:1501、Weber et al. (2011) PLoS One 6:e19722、Li et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39:6315-6325、Zhang et al. (2011) Nat. Biotech. 29:149-153、Miller et al. (2011) Nat. Biotech. 29:143-148、Lin et al. (2014) Nucl. Acids Res. 42:e47を参照されたい)。そのような遺伝子戦略は、当該技術分野でよく知られている方法に従って、構成的発現系または誘発性発現系を使用することができる。

30

40

【0082】

「Piwi相互作用RNA(piRNA)」は、非コードRNA小分子の最大のクラスである。piRNAは、piwiタンパク質との相互作用を通じてRNA-タンパク質複合体を形成する。これらのpiRNA複合体は、生殖系細胞、特に精子形成における生殖

50

系細胞におけるレトロトランスポゾン及び他の遺伝子要素のエピジェネティック遺伝子サイレンシング及び転写後遺伝子サイレンシングの両方に関連している。これらは、サイズ（21～24 ntではなく26～31 nt）、配列保存性が欠如している、及び複雑性が増加している点でマイクロRNA（miRNA）とは異なる。しかしながら、他の小分子RNAと同様に、piRNAは、遺伝子サイレンシング、具体的にはトランスポゾンのサイレンシングに関与していると考えられている。piRNAの大部分は、トランスポゾン配列に対してアンチセンスであり、これは、トランスポゾンがpiRNA標的であることを示唆している。哺乳動物では、トランスポゾンサイレンシングにおけるpiRNAの活性は、胚の発達の間にも最も重要であるようであり、C. elegans及びヒトの両方において、piRNAは、精子形成に必要である。piRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）の形成を介したRNAサイレンシングにおける役割を有する。

10

【0083】

「アプタマー」は、特定の標的分子に結合するオリゴヌクレオチドまたはペプチド分子である。「核酸アプタマー」は、インビトロ選択の反復ラウンドを通じて、または等価的に、SELEX（指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化）を通じて操作されて、小分子、タンパク質、核酸、更には細胞、組織及び生物等の様々な分子標的に結合する核酸種である。「ペプチドアプタマー」は、特定の標的分子に結合するように選択または操作される人工タンパク質である。これらのタンパク質は、タンパク質骨格によって示される可変配列の1つ以上のペプチドループからなる。これらは、典型的には、組み合わせライブラリから単離され、多くの場合、その後、定向変異または可変領域変異誘発及び選択のラウンドによって改善される。ペプチドアプタマーの進化である「アフィマータンパク質」は、特定の標的タンパク質に対して高親和性結合面を提供するペプチドループを示すように操作された、高度に安定した小タンパク質である。シスタチンのシステインプロテアーゼ阻害剤ファミリーに由来する、低分子量12～14 kDaのタンパク質である。アプタマーは、バイオテクノロジー及び治療用途に有用であり、一般的に使用される生体分子である抗体に匹敵する分子認識特性を提供する。それらの識別認識に加え、アプタマーは、試験管内で完全に操作することができ、化学合成によって容易に生成され、所望の貯蔵特性を有し、治療用途において免疫原性がほとんどまたはまったく誘発されないため、抗体よりも利点がある。

20

【0084】

本明細書で「低分子干渉RNA」とも称される「短鎖干渉RNA」（siRNA）は、例えば、RNAiによる標的バイオマーカー核酸の発現を阻害するように機能する薬剤として定義される。siRNAは、化学的に合成されてもよく、インビトロ転写によって産生されてもよいし、宿主細胞内で産生されてもよい。一実施形態では、siRNAは、約15～約40ヌクレオチド長、好ましくは約15～約28ヌクレオチド長、より好ましくは約19～約25ヌクレオチド長、及びより好ましくは約19、20、21、または22ヌクレオチド長の二本鎖RNA（dsRNA）分子であり、約0、1、2、3、4、または5ヌクレオチドの長さを有する各鎖上に3'及び／または5'オーバーハングを含有してもよい。オーバーハングの長さは、2本の鎖間で独立しており、すなわち、1つの鎖上のオーバーハングの長さは、第2の鎖上のオーバーハングの長さに依存しない。好ましくは、siRNAは、標的メッセンジャーRNA（mRNA）の分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）を通じて、RNA干渉を促進することが可能である。

30

40

【0085】

「予防すること」という用語は、当該技術分野で認識されており、筋ジストロフィー等の状態に関連して使用される場合、当該技術分野で十分に理解されており、組成物を投与されない対象と比較して、対象における医学的状态の1つ以上の症状の頻度もしくは重症度を低下させるか、またはその発症を遅らせるための組成物の投与を含む。したがって、筋ジストロフィーの予防は、例えば、例えば、統計的及び／または臨床的に有意な量によって、治療を受けなかった対照集団と比較して、治療を受けた患者の集団における筋力を保持することを含む。同様に、筋ジストロフィーの予防は、治療を受けていない患者に対

50

して、治療を受けている患者が筋ジストロフィーまたは関連する症状を発症する可能性を低減することを含む。

【0086】

本明細書で使用される「進行を遅延またはブロックする」という用語は、筋ジストロフィーなどの状態の速度を遅くするか、または進行を停止させることを指す。疾患の進行は、疾患の自然経過を記述し、一定期間にわたって機能的転帰を測定及びモニターすることによって評価される。例えば、疾患が進行するにつれて、筋力低下及び消耗（萎縮）が進行する。本明細書に記載される組成物の投与は、筋肉の衰弱及び消耗の進行を遅延させ、またはブロックすることができる。

【0087】

用語「対象」は、本明細書で使用される場合、生存している哺乳動物を指し、用語「患者」と互換的に使用され得る。哺乳動物の例には、哺乳動物クラスの任意のメンバー：ヒト、非ヒト霊長類、例えば、チンパンジー、及び他の類人猿及びサル種；牧場動物、例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ；家庭動物、例えば、ウサギ、イヌ、及びネコ；齧歯類、例えば、ラット、マウス及びモルモットを含む実験動物などが含まれるがこれらに限定されない。その用語は、特定の年齢または性別を示さない。

【0088】

本明細書で使用される場合、用語「処置すること」または「処置」は、病態の症状、臨床的兆候、または根底にある病理を減少、停止、または逆行させて、対象の病態を安定化または改善することまたは対象の病態が対象が処置を受けなかった場合と同じ程度悪化する可能性を低下させることを含む。

【0089】

対象の処置方法に関して化合物の「治療的有効量」という用語は、（哺乳動物、好ましくはヒトに対する）所望の投薬レジメンの一部として投与される場合、例えば、任意の医学的処置に適用可能な妥当な利益／リスク比で、疾患または病態が処置されるために、または化粧品目的のために臨床的に許容可能な標準に従う、症状を軽減する、病態を改善する、または疾患病態の発症を遅らせる調製物における化合物（複数可）の量を指す。本明細書における治療的有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別、及び体重、ならびに個体において所望の反応を引き起こすための抗体の能力などの要因に応じて変わり得る。

【0090】

本明細書で使用される場合、特定の疾患、障害、または病態を発症する「リスクのある」個体は、検出可能な疾患または疾患の症状を示してもいなくてもよく、また、本明細書に記載の処置方法の前に検出可能な疾患または疾患の症状を示してもいなくてもよい。「リスクのある」は、個体が、当該技術分野で知られているように、特定の疾患、障害、または病態の発症と相関する測定可能なパラメータである、1つ以上のリスク要因を有することを意味する。これらのリスク要因のうちの1つ以上を有する個体は、これらのリスク要因のうちの1つ以上を有さない個体よりも特定の疾患、障害、または病態を発症する可能性が高い。

【0091】

「慢性」投与は、初期の治療効果（活性）を長期間維持するように、急性様式とは対照的に連続した医薬品（複数可）の投与を指す。「間欠的」投与は、中断することなく連続的に投与されるのではなく、事実上周期的／定期的である処置を指す。

【0092】

本明細書で使用される場合、別の化合物または組成物と「併せた」投与は、同時投与及び／または異なる時点での投与を含む。併せた投与はまた、異なる投薬頻度または間隔、及び同じ投与経路または異なる投与経路を使用することを含む、共製剤としての投与または別々の組成物としての投与を包含する。

【0093】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。本明細書に記載のものと類

10

20

30

40

50

似または同等の任意の方法及び物質も本発明の実践または試験において使用され得るが、好ましい方法及び物質をこれより説明する。本明細書に言及される全ての刊行物は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)), the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987)), Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984), Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press, Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987), Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press, Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons, Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987), PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994), Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991), Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999), Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997), Antibodies (P. Finch, 1997), Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989), Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000), Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999), The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995), 及び Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993)に記載される広く利用されている方法論等、これらの刊行物が引用されるものに関連して、方法及び／または材料を開示及び説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0094】

古典的補体阻害剤

本開示は、広義には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（「DMD」）、ベッカー型筋ジストロフィー（「BMD」）、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）（サルコグリカノ

パチー、ジストログリカノパチー及びジスフェルリンパチーを含む)、V I型コラーゲン関連障害(ベスレム型ミオパチー及びウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー(U C M D)を含む)、先天性筋ジストロフィー(C M D)及び先天性ミオパチー、ならびに遠位性筋ジストロフィー／ミオパチー(三好型ミオパチーを含む)の予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法に関する。方法は、対象に、C 1複合体阻害剤、C 1 q阻害剤、C 1 s阻害剤、C 1 r阻害剤、またはC 1複合体阻害剤等の古典的補体経路の阻害剤を投与することを含む。阻害剤は、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエビジェネティック編集剤であり得る。核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、m i R N A、m i R N A阻害剤、m R N A、アプタマー、またはアンチセンス核酸であり得る。阻害剤は、標的生体分子の活性または発現を減少させることによるものかどうかにかかわらず、標的生体分子の生物学的機能を阻害する能力を有する化合物を指し得る。

10

【0095】

阻害剤は、補体カスケードの活性化を阻止し得、特定の補体タンパク質の発現を阻止し得、補体活性化を誘導するシグナル伝達分子を妨害し得、補体阻害剤の発現を上方制御し得、また、そうでなければ補体の役割を妨害する。

【0096】

C 1複合体、C 1 q、C 1 r、もしくはC 1 s、または抗C 1 q、C 1 r、もしくはC 1 s抗体の変領域の分子構造に基づいて、分子モデリング及び合理的分子設計が使用されて、抗体の結合領域の分子構造を模倣し、及び／またはC 1複合体、C 1 q、C 1 r、もしくはC 1 sの活性を阻害する小分子が生成され、スクリーニングされ得る。これらの小分子は、ペプチド、ペプチド模倣物、オリゴヌクレオチド、または有機化合物であり得る。模倣分子は、補体活性化の阻害剤として使用することができる。代替的には、コンビナトリアル化合物のライブラリから好適な小分子を単離するためにその分野で一般的に使用される大規模スクリーニング手順が使用され得る。

20

【0097】

補体の活性を阻害するいくつかの分子が知られている。既知の化合物に加えて、好適な阻害剤は、本明細書に記載の方法によってスクリーニングすることができる。上述のように、正常細胞は、補体活性をブロックするタンパク質、例えば、C D 5 9、C 1阻害剤等を産生することができる。本開示のいくつかの実施形態では、補体は、かかるポリペプチドをコードする遺伝子の発現を上方制御することによって阻害される。

30

【0098】

補体活性化を阻止する分子の修飾も当該技術分野で知られている。例えば、そのような分子には、可溶性C R 1等の修飾された補体受容体が含まれるが、これらに限定されない。C R 1の最も一般的なアロタイプの成熟タンパク質は、1998個のアミノ酸残基：1930個の残基の細胞外ドメイン、25個の残基の膜貫通領域、及び43個の残基の細胞質ドメインを含有する。細胞外ドメイン全体は、短いコンセンサス反復(S C R)または補体制御タンパク質反復(C C P R)と称される30個の反復単位から構成され、それぞれが60～70個のアミノ酸残基からなる。最近のデータは、C 1 qがヒトC R 1に特異的に結合することを示す。したがって、C R 1は、3つ全ての補体オプソニン、すなわちC 3 b、C 4 b、及びC 1 qを認識する。膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを欠く組換えヒトC R 1(s C R 1)の可溶性バージョンが産生され、天然C R 1の全ての既知の機能を保持することが示されている。いくつかのタイプのヒトC 1 q受容体(C 1 q R)が記載されている。これらには、C 1 qのコラーゲン様ドメインに結合するため、c C 1 q Rと称される、遍在的に分布する60～67 k D a受容体が含まれる。このC 1 q Rバリエーションは、単球貪食作用を調節する126 k D a受容体であるカルレチキュリンであることが示された。g C 1 q Rは、膜結合分子ではなく、C 1 qの球状領域に対する親和性を有する分泌型可溶性タンパク質であり、補体活性化の流体相調整因子として機能し得る。

40

【0099】

崩壊促進因子(D A F)(C D 5 5)は、4つのS C R、及び広範囲のO-結合型グリ

50

コシル化が可能なセリン／トレオニン濃縮ドメインから構成される。DAFは、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーによって細胞膜に結合され、C4b及びC3bに結合するその能力を通じて、C3及びC5変換酵素を解離することによって作用する。可溶性バージョンのDAF（sDAF）は、補体活性化を阻害することが示されている。

【0100】

セリンプロテアーゼ阻害剤の「セルピン」ファミリーのメンバーであるC1阻害剤は、流体相C1活性化を防止する重グリコシル化血漿タンパク質である。C1阻害剤は、C1r及びC1sの活性部位を遮断し、それらをC1qから解離することによって、補体活性化の古典的経路を調節する。

【0101】

補体活性化のペプチド阻害剤としては、C5aが挙げられ、他の阻害分子としては、ファンが挙げられる。

【0102】

本開示で挙げられる全ての配列は、米国特許第10,316,081号、米国特許出願第14/890,811号、米国特許第8,877,197号、米国特許第9,708,394号、米国特許第10,723,788号、米国特許第9,562,106号、米国特許第10,450,382号、米国特許第10,457,745号、国際特許出願第PCT/US2018/022462号（これらの各々は、それが開示する抗体及び関連する組成物について参照により本明細書に組み込まれる）から参照により組み込まれる。

【0103】

抗C1複合体抗体

他の実施形態では、古典的補体経路の阻害剤は、抗C1複合体抗体であり得、任意選択的に、抗C1複合体抗体は、C1rもしくはC1s活性化を阻害するか、またはC2もしくはC4に作用するそれらの能力を妨げ、例えば、抗C1複合体抗体は、C1複合体内の組み合わせエピトープに結合し、当該組み合わせエピトープは、C1q及びC1sの両方、C1q及びC1rの両方、C1r及びC1sの両方、またはC1q、C1r及びC1sのそれぞれのアミノ酸を含む。抗体は、モノクローナル抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、C4の切断を阻害し、かつC2の切断を阻害しないか、またはC2の切断を阻害し、かつC4の切断を阻害しない。

【0104】

いくつかの実施形態では、抗体は、哺乳動物C1q、C1r、もしくはC1sに結合するか、またはヒトC1q、C1r、もしくはC1sに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、哺乳動物C1複合体に結合する。

【0105】

抗補体C1q抗体

本明細書で開示される抗C1q抗体は、C1qの強力な阻害剤であり、任意の期間にわたってC1q機能の継続的阻害のために投薬され、次いでその活性が重要であり得る時点で正常なC1q機能の回復を可能にするために任意選択的に停止される。動物研究において本明細書に開示される抗C1q抗体で得られた結果は、ヒト化またはヒト抗体、ならびにその断片及び／または誘導体を用いて臨床に容易に進展させることができる。

【0106】

C1qは、18個のポリペプチド鎖（6個のC1qのA鎖、6個のC1qのB鎖、及び6個のC1qのC鎖）からなる460kDaの大型多量体タンパク質である。C1r及びC1s補体タンパク質は、C1q尾部領域に結合してC1複合体（C1qr₂s₂）を形成する。

【0107】

本開示の抗C1q抗体は、古典的補体活性化経路のC1複合体における補体因子C1q及び／またはC1qを特異的に認識する。結合した補体因子は、限定されないが、任意の哺乳動物生物、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ

10

20

30

40

50

、ラクダ、ヒツジ、ヤギ、またはブタを含む補体系を有する任意の生物に由来し得る。

【0108】

本明細書で使用される場合、「C1複合体」は、限定されないが、1つのC1qタンパク質、2つのC1rタンパク質、及び2つのC1sタンパク質を含み得るタンパク質複合体（例えば、C1qr²s²）を指す。

【0109】

本明細書に開示される抗C1q抗体は、C1複合体形成を阻害し得る。

【0110】

本明細書で使用される場合、「補体因子C1q」は、野生型配列及び天然に存在するバリエーション配列の両方を指す。

【0111】

本開示の抗体によって認識される補体因子C1qの非限定的な例は、3つのポリペプチド鎖A、B、及びCを含むヒトC1qである：

C1q、鎖A（ホモサピエンス）、アクセッション番号 タンパク質

データベース：NP__057075.1；GenBank番号：NM__015991：

>gi|7705753|ref|NP__057075.1|補体C1q

サブコンポーネントサブユニットA前駆体 [ホモサピエンス]

（配列番号1）

MEGPRGWLVLCLVLAISLASMTEDLCRAPDGKKGEAGRPG
RRGRPGGLKGEQGEPEGAPGIRTGIGQLKGDQGEPPSGNPG
KVGYPGPSPGLGARGIPGIKGTGSGPNIKDQPRPAFSAI
RRNPPMGGNVVIFDTVITNQE E PYQNHSGRFVCTVPGYYY
FTFQVLSQWEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQV
VSGGMVLQLQQGDQVWVEKDKKGHIIYQGSEADSVFSGFL
IFPSA。

【0112】

C1q、鎖B（ホモサピエンス）、アクセッション番号 タンパク質

データベース：NP__000482.3；GenBank No.：NM__000491.3：

>gi|87298828|ref|NP__000482.3|補体Clq

サブコンポーネントサブユニットB前駆体 [ホモサピエンス]

（配列番号2）

MMMKIPWGSIPVLM L L L L L GLIDISQAQLSCTGPPAIPGI
PGIPGTPGPDGQPGTPGIKGEKGLPGLAGDHGEFGEKGD
GIPGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGDYKATQ
KIAFSATR T IN V PLRRDQTIRFDHVITNMNNNYEPRSGKF
TCKVPGLYYFTYHASSRGNLCVNLMRGRERAQKVVTFCDY
AYNTFQVTTGGMV L KLEQGENVFLQATDKNSLLGMEGANS
IFSGFLLFPDMEA。

【0113】

C1q、鎖C（ホモサピエンス）、アクセッション番号 タンパク質

データベース：NP__001107573.1；GenBank番号：

NM__001114101.1：

>gi|166235903|ref|NP__001107573.1|補体C1q

サブコンポーネントサブユニットC前駆体 [ホモサピエンス]

（配列番号3）

MDVGPSSSLPHLGLKL L L L L L LPLRGQANTGCYGI PGMPG
LPGAPGKDG Y DGLPGPKGEPIPAIPGIRGPKGQKGEPL
PGHPGKNGPMGPPGMPGVPGPMGIPGEPGE E GR Y KQKFQS
VFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTSTGKFTC

KVPGLYYFVYHASHTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTN
QVNSGGVLLRLQVGEEVWLAVNDYYDMVG IQGSDSVFSGF
LLFPD.

【0114】

したがって、本開示の抗C1q抗体は、C1qタンパク質のポリペプチド鎖A、ポリペプチド鎖B、及び／またはポリペプチド鎖Cに結合し得る。いくつかの実施形態では、本開示の抗C1q抗体は、ヒトC1qまたはそのホモログ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ラクダ、ヒツジ、ヤギ、またはブタC1qのポリペプチド鎖A、ポリペプチド鎖B、及び／またはポリペプチド鎖Cに結合する。いくつかの実施形態では、抗C1q抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片またはその誘導体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、Fab断片などの抗体断片である。

10

【0115】

抗体M1の軽鎖及び重鎖可変ドメイン配列

抗体M1に関連して言及される全ての配列は、米国特許第9,708,394号（それが開示する抗体及び関連する組成物について参照により本明細書に組み込まれる）から参照により組み込まれる。

【0116】

標準的な技術を使用して、抗体M1の軽鎖可変及び重鎖可変ドメインをコードする核酸及びアミノ酸配列を決定した。抗体M1の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、以下である：

20

【0117】

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSINKYLAWYQEKPGK
TNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA
MYYCQQHNEYPLTFGAGTKLELK（配列番号4）

【0118】

軽鎖可変ドメインの超可変領域（HVR）を、太字かつ下線の文字で示す。いくつかの実施形態では、M1軽鎖可変ドメインのHVR-L1は配列RASKSINKYLA（配列番号5）を有し、M1軽鎖可変ドメインのHVR-L2は配列SGSTLQS（配列番号6）を有し、M1軽鎖可変ドメインのHVR-L3は配列QQHNEYPLT（配列番号7）を有する。

30

【0119】

抗体M1の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、以下である：

【0120】

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYHFTSYWMHWVKQRPG
QGLEWIGVIHPNSGSIINYNEKFESKATLTVDKSSSTAYMQLS
SLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLPMDYWGQGTSTVTVSS（配列番号8）

40

【0121】

重鎖可変ドメインの超可変領域（HVR）を、太字かつ下線の文字で示す。いくつかの実施形態では、M1重鎖可変ドメインのHVR-H1は配列GYHFTSYWMH（配列番号9）を有し、M1重鎖可変ドメインのHVR-H2は配列VIHPNSGSIINYNEKFES（配列番号10）を有し、M1重鎖可変ドメインのHVR-H3は配列ERD

50

STEVLPMDY（配列番号11）を有する。

【0122】

軽鎖可変ドメインをコードする核酸配列は、以下であることが決定された：

GATGTC CAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCAT
CTCCTGGAGAAACCATTA CTATTAATTG CAGGGCAAGTAA
GAGCATTAACA AATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCT
GGGAA AACTAATAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTT
TGCAATCTGG AATTCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGATC
TGGTACAGATTTC ACTCTCACCATCAGTAGCCCTGGAGCCT
GAAGATT TTTGCAATGTATTA CTGTCAACAACATAATGAAT
ACCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA
A（配列番号12）。

10

【0123】

重鎖可変ドメインをコードする核酸配列は、以下であることが決定された：

CAGGTCCA ACTG CAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTAAAGC
CTGGGGCTTTCAGTGAAGTTGTCTCTGCAAGTCTTCTGGCTA
CCATTTTCAC CAGCTACTGGATGC ACTGGGGTGAAGCAGAGG
CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTCA TCCTA
ATAGTGGTAGTATTA ACTACAATGAGGAAGTTTCGAGAGCAA
GGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCGGCGGGTCT
ATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCC
TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA CCGTCTCC
TCA（配列番号13）。

20

【0124】

物質の寄託

以下の物質は、ブダペスト条約に従ってAmerican Type Culture
Collection, ATCC Patent Depository, 10801
University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209,
USA（ATCC）に寄託された：

30

【表2】

試料ID	アイソタイプ	寄託	ATCC
		日付	アクセッション番号
マウスハイブリドーマC1qM1 7788-1(M)051613 産生 抗C1q抗体M1	IgG1、 カップ	6月6日、 2013	PTA-120399

40

【0125】

培養物の入手が、特許出願の係属中及び30年間、または最新の請求から5年後、または特許の有効期間のうち長い方まで、利用可能となることを保証する条件下で、M1抗体を生成するハイブリドーマ細胞株（マウスハイブリドーマC1qM1 7788-1（M）051613）がATCCに寄託されている。寄託物は、その期間中に生存できなくなった場合に置き換えられる。寄託物は、本出願の対応出願、またはその子孫が出願された国における外国特許法によって要求されるように利用可能である。しかしながら、寄託物の利用可能性は、政府の措置によって付与された特許権を逸脱して本発明を実施するため

50

のライセンスを構成するものではないことが理解されるべきである。

【0126】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、HVR-L1の配列番号5、HVR-L2の配列番号6、HVR-L3の配列番号7、HVR-H1の配列番号9、HVR-H2の配列番号10、及びHVR-H3の配列番号11のうちの1つ以上を含む。

【0127】

抗体は、好ましくはHVR-L1 RASKSINKYLA（配列番号5）、HVR-L2 SGSTLQS（配列番号6）、及びHVR-L3 QQHNEYPLT（配列番号7）を保持しつつ、配列番号4と少なくとも85%、90%、または95%同一の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含み得る。抗体は、好ましくはHVR-H1 GYHFTSYWMH（配列番号9）、HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES（配列番号10）、及びHVR-H3 ERDSTEVLPM DY（配列番号11）を保持しつつ、配列番号8と少なくとも85%、90%、または95%同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含み得る。

【0128】

ヒト化抗補体C1q抗体

本開示のヒト化抗体は、古典的補体経路のC1複合体における補体因子C1q及び／またはC1qタンパク質に特異的に結合する。ヒト化抗C1q抗体は、ヒトC1q、ヒト及びマウスC1q、ラットC1q、またはヒトC1q、マウスC1q、及びラットC1qに特異的に結合し得る。

【0129】

ヒト化抗C1q抗体に関連して言及される全ての配列は、米国特許第10,316,081号（それが開示する抗体及び関連する組成物について参照により本明細書に組み込まれる）から参照により組み込まれる。

【0130】

いくつかの実施形態では、ヒト重鎖定常領域は、配列番号47のアミノ酸配列、または配列番号47と少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%の相同性を有するアミノ酸配列を含むヒトIgG4重鎖定常領域である。ヒトIgG4重鎖定常領域は、Kabab番号付けに従って1つ以上の改変及び／またはアミノ酸置換を有するFc領域を含み得る。そのような場合には、Fc領域は、位置248におけるロイシンからグルタメートへのアミノ酸置換を含み、そのような置換は、Fc領域がFc受容体と相互作用することを阻害する。いくつかの実施形態では、Fc領域は、位置241におけるセリンからプロリンへのアミノ酸置換を含み、そのような置換は、抗体におけるアームスイッチを防止する。

【0131】

ヒトIgG4（S241P L248E）重鎖定常ドメインのアミノ酸配列は、以下である：ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT KT YTCNV D HKPSNTKVDKR VESKYGP P C P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K（配列番号47）。

【0132】

抗体は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み得、重鎖可変ドメインは、配列番号31～34のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列、または配列番号31～34のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%の相同性を有するアミ

ノ酸配列を含む。ある特定のそのような実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号 35～38 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列、または配列番号 35～38 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む。

【0133】

重鎖可変ドメインバリエーション 1 (VH1) のアミノ酸配列は、以下である：

【0134】

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPG
QGLEWIGV^{IHPNSGS}INYN^{NEKFES}KATITVDKSTSTAYMQLS
SLTSEDSAVYYCAG^{ERDSTEVL}PMDYWGQGTSTVTVSS (配列番号
31)

10

VH1 の超可変領域 (HVR) は、太字かつ下線の文字で示されている。

【0135】

重鎖可変ドメインバリエーション 2 (VH2) のアミノ酸配列は、以下である：

【0136】

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPG
QGLEWIGV^{IHPNSGS}INYN^{NEKFES}RATITVDKSTSTAYMELS
SLRSEDTAVYYCAG^{ERDSTEVL}PMDYWGQGT^{TT}VTVSS (配列番号
32)

20

VH2 の超可変領域 (HVR) は、太字かつ下線の文字で示されている。

【0137】

重鎖可変ドメインバリエーション 3 (VH3) のアミノ酸配列は、以下である：

【0138】

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPG
QGLEWIGV^{IHPNSGS}INYN^{NEKFES}RV^{TI}ITVDKSTSTAYMELS
SLRSEDTAVYYCAG^{ERDSTEVL}PMDYWGQGT^{TT}VTVSS (配列番号
33)

30

VH3 の超可変領域 (HVR) は、太字かつ下線の文字で示されている。

【0139】

重鎖可変ドメインバリエーション 4 (VH4) のアミノ酸配列は、以下である：

【0140】

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCCKSSGYHFTSYWMHWV^RQAPG
QGLEWIGV^{IHPNSGS}INYN^{NEKFES}RV^{TI}ITVDKSTSTAYMELS
SLRSEDTAVYYCAG^{ERDSTEVL}PMDYWGQGT^{TT}VTVSS (配列番号
34)

40

50

V H 4 の超可変領域 (H V R) は、太字かつ下線の文字で示されている。

【 0 1 4 1 】

カッパ軽鎖可変ドメインバリエーション 1 (V κ 1) のアミノ酸配列は、以下である：

【 0 1 4 2 】

DVQITQSPSYLAASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGK
TNKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA
MYYCQQQHNEYPLTFGQGGTKLEIK (配列番号 35)

10

V κ 1 の超可変領域 (H V R) は、太字かつ下線の文字で示されている。

【 0 1 4 3 】

カッパ軽鎖可変ドメインバリエーション 2 (V κ 2) のアミノ酸配列は、以下である：

【 0 1 4 4 】

DVQITQSPSSLSASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGK
ANKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA
MYYCQQQHNEYPLTFGQGGTKLEIK (配列番号 36)

20

V κ 2 の超可変領域 (H V R) は、太字かつ下線の文字で示されている。

【 0 1 4 5 】

カッパ軽鎖可変ドメインバリエーション 3 (V κ 3) のアミノ酸配列は、以下である：

【 0 1 4 6 】

DVQITQSPSSLSASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGK
APKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA
MYYCQQQHNEYPLTFGQGGTKLEIK (配列番号 37)

30

V κ 3 の超可変領域 (H V R) は、太字かつ下線の文字で示されている。

【 0 1 4 7 】

カッパ軽鎖可変ドメインバリエーション 4 (V κ 4) のアミノ酸配列は、以下である：

【 0 1 4 8 】

DIQLTQSPSSLSASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGK
APKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA
MYYCQQQHNEYPLTFGQGGTKLEIK (配列番号 38)

40

V κ 4 の超可変領域 (H V R) は、太字かつ下線の文字で示されている。

【 0 1 4 9 】

抗体は、HVR-L1 RASKSINKYLA (配列番号 5)、HVR-L2 SG
STLQS (配列番号 6)、及び HVR-L3 QQHNEYPLT (配列番号 7) を保
持しつつ、配列番号 35～38 と少なくとも 85%、90%、または 95% 同一の軽鎖可
変ドメインアミノ酸配列を含み得る。抗体は、好ましくは HVR-H1 GYHFTSY
WMH (配列番号 9)、HVR-H2 VIHPNSGSINYNEKFES (配列番号
10)、及び HVR-H3 ERDSTEVLPM DY (配列番号 11) を保持しつつ、
配列番号 31～34 と少なくとも 85%、90%、または 95% 同一の重鎖可変ドメイン
アミノ酸配列を含み得る。

50

【0150】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号35の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及び配列番号31の重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号36の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及び配列番号32の重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号37の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及び配列番号33の重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号38の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及び配列番号34の重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。

【0151】

いくつかの実施形態では、本開示のヒト化抗C1q抗体は、Fab領域を含有する重鎖可変領域及びFc領域を含有する重鎖定常領域を含み、Fab領域は本開示のC1qタンパク質に特異的に結合するが、Fc領域はC1qタンパク質に結合することが不可能である。いくつかの実施形態では、Fc領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプに由来する。いくつかの実施形態では、Fc領域は、補体活性を誘導することが不可能であり、及び／または抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導することが不可能である。いくつかの実施形態では、Fc領域は、限定されないが、アミノ酸置換を含む、1つ以上の改変を含む。ある特定の実施形態では、本開示のヒト化抗C1q抗体のFc領域は、Kabata番号付け慣例に従う位置248またはKabata番号付け慣例に従う位置248に対応する位置で、及び／またはKabata番号付け慣例に従う位置241またはKabata番号付け慣例に従う位置241に対応する位置でアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、位置248または位置248に対応する位置でのアミノ酸置換は、Fc領域がFc受容体と相互作用することを阻害する。いくつかの実施形態では、位置248または位置248に対応する位置でのアミノ酸置換は、ロイシンからグルタメートへのアミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、位置241または位置241に対応する位置でのアミノ酸置換は、抗体におけるアームスイッチを防止する。いくつかの実施形態では、位置241または位置241に対応する位置でのアミノ酸置換は、セリンからプロリンへのアミノ酸置換である。ある特定の実施形態では、本開示のヒト化抗C1q抗体のFc領域は、配列番号47のアミノ酸配列、または配列番号47のアミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。

【0152】

抗C1q Fab断片

組換えDNA技術の出現の前は、抗体分子の構造を切断し、分子のどの部分がある様々な機能を担っているのかを決定するために、ポリペプチド配列を切断するタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)が使用されていた。プロテアーゼパパインの限定消化は、抗体分子を3つの断片に切断する。Fab断片として知られている2つの断片は同一であり、抗原結合活性を含有する。Fab断片は、抗体分子の2つの同一の腕部に対応し、その各々は、重鎖のV_H及びC_H1ドメインと対合した完全軽鎖からなる。他の断片は、抗原結合活性を含まないが、容易に結晶化することが当初観察され、この理由からFc断片(結晶化可能断片)と名付けられた。Fab分子をIgG分子と比較した場合、Fabは、それらのより高い移動性及び組織浸透能力、それらの減少した循環半減期、抗体エフェクター機能を媒介することなく一価で抗原に結合するそれらの能力、ならびにそれらのより低い免疫原性のため、ある特定のインビボ用途についてIgGよりも優れていることが見出された。

【0153】

Fab分子は、定常ドメインC_H2及びC_H3によって短縮された重鎖を有するIg分子の人工の約50kDaの断片である。2つの異好性(V_L-V_H及びC_L-C_H1)ドメイン相互作用は、Fab分子の2つの鎖の構造の基礎にあり、これはC_LとC_H1との間のジスルフィド架橋によって更に安定化される。Fab及びIgGは、6つの相補性決

定領域（CDR）（3つはそれぞれV_L及びV_Hに由来する（LCDR1、LCDR2、LCDR3及びHCDR1、HCDR2、HCDR3））によって形成される同一の抗原結合部位を有する。CDRは、抗体の超可変抗原結合部位を画定する。最も高い配列バリエーションは、LCDR3及びHCDR3に見られ、これは天然免疫系では、それぞれV_L及びJ_L遺伝子またはV_H、D_H及びJ_H遺伝子の再編成によって生成される。LCDR3及びHCDR3は典型的には、抗原結合部位のコアを形成する。6つのCDRを接続し、提示する保存領域は、フレームワーク領域と称される。可変ドメインの三次元構造において、フレームワーク領域は、外側では超可変CDRループによって及び内側では保存ジスルフィド架橋によって連結された2つの対向する逆平行β-シートのサンドイッチを形成する。Fab及びIgGの抗原結合部位の安定性及び汎用性のこの独自の組み合わせは、疾患の診断、モニタリング、予防、及び処置のための臨床業務においてその成功を強調する。

10

【0154】

全ての抗C1q抗体Fab断片配列は、米国特許第10,723,788号（それが開示する抗体及び関連する組成物について参照により本明細書に組み込まれる）から参照により組み込まれる。

【0155】

ある特定の実施形態では、本開示は、重鎖（V_H/C_H1）及び軽鎖（V_L/C_L）を含むC1qタンパク質に結合する抗C1q抗体Fab断片であって、抗C1q抗体Fab断片は、6つの相補性決定領域（CDR）（3つはそれぞれV_L及びV_Hに由来する）（HCDR1、HCDR2、HCDR3、及びLCDR1、LCDR2、LCDR3）を有する、抗C1q抗体Fab断片を提供する。抗体Fab断片の重鎖は、IgG1の第1の重鎖ドメインの後で切断され（配列番号39）、以下のアミノ酸配列を含む：

20

【0156】

[外11]

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSSGYHFTSYWMHWVKQAPG
QGLEWIGV¹IHPNSGS²INYN³EKFES⁴RV⁵TI⁶TV⁷DK⁸ST⁹ST¹⁰AY¹¹MEL¹²S¹³
SLRSED¹⁴TAVYYCAG¹⁵ERD¹⁶STE¹⁷VLPMDY¹⁸WGQ¹⁹GTT²⁰TV²¹TV²²SS²³AST²⁴KG²⁵
PSVF²⁶PLAPSSK²⁷STSGG²⁸TAALGCLVKDYFPEP²⁹VT³⁰VS³¹WNSGALT³²
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV³³VT³⁴VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK³⁵
VDKKVEPKSCDKTHT（配列番号39）

30

【0157】

配列番号1の相補性決定領域（CDR）を、太字かつ下線の文字で示す。

【0158】

抗体Fab断片の軽鎖ドメインは、以下のアミノ酸配列（配列番号40）を含む：

【0159】

40

[外12]

DVQITQSPSSLSASLGERATINCRASKSINKYLAWYQQKPGK
APKLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLT¹ISSLEPEDFA
MYYCQQHNEYP²LT³FGQGT⁴KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASV⁵VCLLN⁶NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSL⁷STLT⁸LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC（配列番号40）

50

【0160】

配列番号2の相補性決定領域(CDR)を、太字かつ下線の文字で示す。

【0161】

抗補体C1s抗体

好適な阻害剤には、補体C1sタンパク質に結合する抗体(すなわち、本明細書で抗C1s抗体及びC1s抗体とも称される抗補体C1s抗体)及びそのような抗体をコードする核酸分子が含まれる。補体C1sは、補体カスケードにおいて上流にあり、狭い範囲の基質特異性を有するので魅力的な標的である。更に、活性化形態のC1sに特異的に結合する抗体(例えば、限定されないが、モノクローナル抗体)を得ることが可能である。

【0162】

抗C1s抗体の例は、米国特許出願第14/890,811号及び米国特許第8,877,197号に開示されており、それが開示する抗体及び関連する組成物について、参照により本明細書に組み込まれる。

【0163】

ある特定の態様では、本明細書では、抗C1s抗体を投与する方法が開示される。抗体は、マウス抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体であり得る。いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含み、重鎖は、5/15/2013にATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞株またはその子孫(ATCCアクセッション番号PTA-120351)によって生成されるマウス抗ヒトC1sモノクローナル抗体5A1のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。他の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含み、重鎖可変ドメインは、5/15/2013にATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞株またはその子孫(ATCCアクセッション番号PTA-120352)によって生成されるマウス抗ヒトC1sモノクローナル抗体5C12のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。

【0164】

核酸、ベクター及び宿主細胞

本開示の方法において使用するのに好適な抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されているように、組換え方法及び組成物を使用して生成され得る。いくつかの実施形態では、本開示の抗体のいずれかをコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸が提供される。そのような核酸は、抗C1q、抗C1rまたは抗C1s抗体のV_L/C_Lを含有するアミノ酸配列及び/またはV_H/C_{H1}を含有するアミノ酸配列をコードし得る。いくつかの実施形態では、そのような核酸を含有する1つ以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。そのような核酸を含有する宿主細胞も提供され得る。宿主細胞は、(1)抗体のV_L/C_Lを含有するアミノ酸配列及び抗体のV_H/C_{H1}を含有するアミノ酸配列をコードする核酸を含有するベクター、または(2)抗体のV_L/C_Lを含有するアミノ酸配列をコードする核酸を含有する第1のベクター及び抗体のV_H/C_{H1}を含有するアミノ酸配列をコードする核酸を含有する第2のベクターを含有し得る(例えば、形質導入されている)。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、真核、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはリンパ細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、E. coliなどの細菌である。

【0165】

抗C1q、抗C1rまたは抗C1s抗体を作製する方法が本明細書に開示される。方法は、抗C1q、抗C1rまたは抗C1s抗体をコードする核酸を含有する本開示の宿主細胞を、抗体の発現に好適な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、抗体はその後、宿主細胞(または宿主細胞培地)から回収される。

【0166】

抗体スクリーニング

候補抗体は、補体活性化を調整する能力についてスクリーニングされ得る。そのような

10

20

30

40

50

スクリーニングは、インビトロモデル、遺伝子変化した細胞もしくは動物、または精製タンパク質を使用して実施され得る。インビトロ培養システムなどの多様なアッセイがこの目的のために使用され得る。

【0167】

候補抗体はまた、結合アッセイなどによってコンピュータベースのモデリングを使用して同定され得る。抗体が結合するかどうか、またはそうでなければ補体活性に影響を及ぼすかどうかを決定するために、様々なインビトロモデルが使用され得る。かかる候補抗体は、健康ドナーからの血漿を接触させ、補体活性化を（例えば、抗原 C3c 捕捉 ELISA によって）決定することによって試験され得る。

【0168】

通常、複数のアッセイの混合は、様々な濃度に対する異なった反応を得るために異なる抗体濃度で並行して実行される。典型的には、これらの濃度のうちの1つは、陰性対照、すなわち、ゼロ濃度または検出レベル未満として機能する。

【0169】

薬学的組成物及び投与

本開示の補体阻害剤（例えば、抗体、抗体断片及び／または抗体誘導体）は、薬学的組成物の形態で投与され得る。

【0170】

本開示の阻害剤（例えば、抗体、抗体断片及び／または抗体誘導体）の治療製剤は、所望の純度を有する阻害剤を任意の薬学的に許容可能な担体、賦形剤または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]）と混合することによって保存のために凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製され得る。許容可能な担体、賦形剤、または安定化剤は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、これには緩衝液、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む単糖、二糖、及び他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；及び／または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。

【0171】

阻害剤はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル内に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル）中、またはマクロ乳濁液中に取り込まれ得る。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

【0172】

投与のために使用される製剤は無菌であり得る。これは、滅菌濾過膜を介する濾過によって容易に達成される。

【0173】

10

20

30

40

50

本開示の抗体、抗体断片及び／または抗体誘導体ならびに組成物は典型的には、局所、非経口、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内、及び病巣内投与を含むがこれらに限定されない様々な経路によって投与される。非経口投与経路には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、髄腔内、または皮下投与が含まれる。

【0174】

薬学的組成物はまた、所望の製剤に応じて、動物またはヒト投与のための薬学的組成物を製剤化するために一般的に使用されるビヒクルとして定義される、希釈剤の薬学的に許容可能な非毒性担体を含み得る。希釈剤は、組み合わせの生物学的活性に影響を及ぼさないように選択される。そのような希釈剤の例は、蒸留水、緩衝水、生理的生理食塩水、PBS、リンゲル液、デキストロース溶液、及びハックス溶液である。加えて、薬学的組成物または製剤は、他の担体、アジュバント、または非毒性、非治療性、非免疫原性安定化剤、賦形剤などを含み得る。組成物はまた、およそその生理的条件のための追加の物質、例えば、pH調整及び緩衝剤、毒性調整剤、湿潤剤及び洗浄剤を含み得る。

10

【0175】

組成物はまた、例えば、抗酸化剤などの多様な安定化剤のいずれかを含み得る。薬学的組成物がポリペプチドを含む場合、ポリペプチドは、ポリペプチドのインビボ安定性を向上させるか、またはそうでなければその薬理学的特性を向上させる（例えば、ポリペプチドの半減期を増加させる、その毒性を低下させる、他の薬物動態及び／または薬力学的特性を向上させる、または溶解性もしくは取り込みを向上させる）様々なよく知られている化合物と複合体化され得る。

20

【0176】

活性成分の毒性及び治療の有効性は、例えば、LD₅₀（集団の50％に対して致死的な用量）及びED₅₀（集団の50％において治療的に有効な用量）を決定することを含む、細胞培養及び／または実験動物における標準的な薬学的手順に従って決定され得る。毒性と治療効果との間の用量比は治療指数であり、それは比LD₅₀／ED₅₀として表され得る。高い治療指数を示す化合物が好ましい。

【0177】

本明細書に記載の薬学的組成物は、多様な異なる方法で投与され得る。例には、経口、鼻腔内、直腸、局所、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、真皮下、経皮、髄腔内、及び頭蓋内方法を介して薬学的に許容可能な担体を含む組成物を投与することが含まれる。

30

【0178】

非経口投与に好適な製剤には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含む水性及び非水性の等張性滅菌注射溶液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、及び防腐剤を含み得る水性及び非水性滅菌懸濁液が含まれる。

【0179】

薬学的組成物を製剤化するために使用される成分は、好ましくは、高純度のものであり、潜在的に有害な混入物質を実質的に含まない（例えば、少なくとも国の食品（National Food（NF））グレード、通常は少なくとも分析グレード、より典型的には少なくとも薬学的グレード）。更に、非経口的使用のために意図される組成物は通常、無菌である。所与の化合物が使用前に合成されなければならない限り、得られる生成物は、合成または精製プロセスの間に存在し得る任意の潜在的に毒性の物質、特に任意のエンドトキシンは典型的には実質的に含まれない。非経口投与のための組成物もまた、典型的には実質的に等張性であり、GMP条件下で生成される。

40

【0180】

特定の患者に与えられる治療組成物の有効量は、多様な要素に依存し得、そのいくつかは患者毎に異なり得る。適任の臨床医は、患者に投与するための治療剤の有効量を決定することができる。薬剤の投薬量は、治療、投与経路、治療剤の特質、患者の治療剤に対する感受性などに依存する。LD₅₀動物データ及び他の情報を利用して、臨床医は、投与経路に応じて、個体のための最大安全用量を決定し得る。通常の技術を利用して、適任の

50

臨床医は、日常的な臨床試験の過程で特定の治療組成物の投薬量を最適化することができる。組成物は、一連の複数回の投与で対象に投与され得る。治療組成物に関して、定期的な周期的投与が時に必要とされる場合があり、または望ましい場合がある。治療レジメンは薬剤に応じて変わる；例えば、いくつかの薬剤は、1日1回または1日2回のベースで長期間摂取され得る一方で、より選択的な薬剤は、例えば、1、2、3日またはそれ以上、1週以上、1ヶ月以上などのより規定された期間で1日1回、1日2回、週2回、週1回などで摂取されるように投与され得る。

【0181】

処置方法

本開示は、広義には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）（サルコグリカノパチー、ジストログリカノパチー及びジスフェルリンパチーを含む）、VI型コラーゲン関連障害（ベスレム型ミオパチー及びウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー（UCMD）を含む）、先天性筋ジストロフィー（CMD）及び先天性ミオパチー、ならびに遠位性筋ジストロフィー／ミオパチー（三好型ミオパチーを含む）の予防、発症リスクの低減、進行の遅延もしくはブロック、または治療方法に関する。該方法は、対象に、C1複合体阻害剤、C1q阻害剤、C1s阻害剤、またはC1r阻害剤等の古典的補体経路の阻害剤を投与することを含む。阻害剤は、抗体、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、遺伝子編集剤、塩基編集剤、またはエビジェネティック編集剤であり得る。核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNA、miRNA阻害剤、mRNA、アプタマー、またはアンチセンス核酸であり得る。阻害剤は、標的生体分子の活性または発現を減少させることによるものかどうかにかかわらず、標的生体分子の生物学的機能を阻害する能力を有する化合物を指し得る。かかる方法は、C1q阻害剤を対象に投与することを含む。本明細書に記載の本発明の任意の態様に適用され得る多数の実施形態が更に提供される。例えば、いくつかの実施形態では、C1q阻害剤は、抗体、アプタマー、アンチセンス核酸または遺伝子編集剤である。いくつかの実施形態では、阻害剤は、抗C1q抗体である。抗C1q抗体は、C1qと自己抗体との間またはC1qとC1rとの間、またはC1qとC1sとの間の相互作用を阻害し得、または循環もしくは組織からのC1qのクリアランスを促進し得る。

【0182】

組成物は、インビボ使用のために医師の指導の下で得られ、使用され得ることが企図される。治療製剤の投薬量は、疾患の特質、投与の頻度、投与の様式、宿主からの薬剤のクリアランスなどに応じて広く変わり得る。

【実施例】

【0183】

実施例1：材料及び方法

特に明記しない限り、本実施例1に記載の方法及び材料を、本明細書に記載の実施例において使用した。

【0184】

マウス

動物の、餌料及び水に対する自由摂取の状態を維持し、12：12時間の明／暗サイクルで、一定の温度（19～22℃）で維持した。C57BL／6Jマウス（Charles River Laboratories）を野生型（WT）動物として用いた。B6Ros.Cg-Dmdmdx-4Cv/Jマウス（Charles River Laboratories、本明細書ではmdx^{4Cv}と称される）をMDXマウスとして使用した。抗C1qブロッキング抗体（マウス抗体）を用いた実験のために、Pax7-Cre^{ER}雄をR26R^{YFP}/YFP雌（The Jackson Laboratory）に交配して、Pax7Cre^{ER}/WT；R26R^{YFP}/WT雄を得た。これらのブリーダーを、雌のmdx^{4Cv}/4Cvに交配して、雄の実験動物（Pax7Cre^{ER}/WT；R26R^{YFP}/WT；mdx^{4Cv}）を得た。タモキシフェン（T5648 Sigma）を50mg/mlで92.5%のトウモロコシ油／7.5%のエタノールに溶解

させ、2.5 mgを54日齢の実験マウスに毎日8日間腹腔内投与した。Lyz2Cre^{+/−}; C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}世代については、C1qa^{FL/FL} (The Jackson Laboratory) 雄をC1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv/4Cv}雌に交配して、C1qa^{FL/WT}; mdx^{4Cv}雄を得た。これらの雄を、C1qa^{WT/WT}; mdx^{4Cv/4Cv}雌に交配して、C1qa^{FL/WT}; mdx^{4Cv/4Cv}雌を得、それをC1qa^{FL/WT}; mdx^{4Cv}雄に交配して、C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv/4Cv}雌を得た。Lyz2Cre^{+/+} (The Jackson Laboratory) 雄をLyz2Cre^{−/−}; mdx^{4Cv/4Cv}雌に交配して、Lyz2Cre^{+/−}; mdx^{4Cv}雄を得た。これらのブリーダーをC1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv/4Cv}雌に交配して、Lyz2Cre^{+/−}; C1qa^{FL/WT}; mdx^{4Cv}雄を得た。最後に、C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv/4Cv}雌をLyz2Cre^{+/−}; C1qa^{FL/WT}; mdx^{4Cv}雄に交配して、雄実験動物 (Lyz2Cre^{+/−}; C1qa^{FL/FL}; mdx^{4Cv}、本明細書ではC1qa^{KO}; mdx^{4Cv}マウスと称される) を得た。ゲノタイピングは、表1に列挙するプライマーを用いて行った。
【表3】

10

表1. PCRのゲノタイピングのためのプライマーリスト

遺伝子	順方向プライマー	逆方向プライマー	T _{Ann}
C1qa	tgcattctgcatctcct(配列番号 41)	gaaagtgttaaagaaccactg(配列番号 42)	60°C
Cre	gcatttctggggattgtta(配列番号 43)	cccggcaaacaggtagtta(配列番号 44)	53.7°C
YFP	aagttcatctgcaccaccg(配列番号 45)	tccttgaagaagatggtgcg(配列番号 46)	53.7°C

20

【0185】

行動試験

行動試験の前に、マウスを、ストレスレベルを制限するために、同じオペレータによる定期的な処理に供した。試験は、マウスの暗期時間中の同じ時間に一貫して実施した。全ての行動試験は盲検で実施した。

30

【0186】

四肢ぶら下がり試験

四肢ぶら下がり試験プロトコルは、Treat-NDM Neuromuscular Network SOP DMD_M2.2.1.005から適合した。試験の前に、マウスを秤量して、体重による正規化を行った。40 cm×30 cmの金属グリッドを、十分な床敷（すなわち、紙及び木材チップ）を備えた機の40 cm上に配置して、ソフトランディングを確実にした。マウスをグリッド上に配置し、3〜5秒間この環境に順応させた後、グリッドを反転させ、40 cmの高さで保持した。所定の時間制限（900秒）より前にマウスがグリッドから外れた場合、それらは直ちに更に2回試行された。合計ぶら下がり時間を記録した。試験を1日おきに3回繰り返した。

40

【0187】

両肢グリップ試験

両肢グリップ強度試験プロトコルは、Treat-NMD Neuromuscular Network SOP DMD_M2.2.001から適合させた。試験の前に、マウスを秤量して、体重による正規化を行った。マウスの前肢のみを、カトランスデューサーと電子ユニット（47200-グリップ強度メーター-Ugo Basile）に接続された金属製の台形に取り付けた。マウスの尻尾をやさしく引っ張った。最大グリップ強度及び試験の合計時間（すなわち、マウスが台形に取り付けられた合計時間）を4回記録し、これらの測定値の平均値を計算した。試験を6回（C1qa^{KO} Cntrマウス：3日間連続して3回の試験、次いで5日間交互に3回の更なる試験）または3回（交互

50

にWTマウス) 繰り返した。

【0188】

オープンフィールド試験

オープンフィールド試験プロトコルは、Treat-NDM Neuromuscular Network SOP DMD_M2.2.1.002から適合させた。四肢ぶら下がり試験の直後に、マウスを40cm×40cmのアリーナに入れ、自由に移動させ、5分または6分間探索させた。試験を記録し、ANY-mazeソフトウェアまたはEthoVision XTソフトウェアを使用して動作データを解析した。試験を1日おきに3回繰り返した。

【0189】

ロータロッド試験

ロータロッド試験は、LE8205 Panlab Harvard Apparatusを使用して行った。試験の前に、マウスを秤量して、体重による正規化を行った。ロータロッドの速度を6rpmの一定値に設定した。1時間後、速度を12rpmの一定値に増加させた。マウスがロッドから落ちた場合、それらをすぐに更に3回試験した。総歩行時間を記録した。試験を6日間繰り返した(3日連続して3回の試験、次いで5日後、隔日に3回の更なる試験)。

【0190】

血漿及び血清の採取及び調製

マウスをランプの下で数分間加熱して血流を増加させた。顎下静脈の領域を針先で貫通し、頬からの血流を試験管に採取した。血液試料を室温で1時間インキュベートし、2,000gで4℃で10分間遠心分離した。上清(血清)を回収した。あるいは、血液をEDTA治療チューブに採取した。試料を2,000gで4℃で10分間遠心分離し、上清(血漿)を回収した。

【0191】

単細胞の単離

野生型及びジストロフィー性マウス由来の後肢筋(すなわち、腓腹筋、EDL、前脛骨筋及び大腿四頭筋)を解剖し、前述のように処理して、単核細胞を得た。筋肉を洗浄培地(10%FBS、1%L-グルタミン、及び1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補充したHam's F-10)で洗浄し、筋肉解離緩衝液(1%L-グルタミン及び1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補充したHam's F-10で調製された700~800U/mlのコラゲナーゼII(Worthington Biochemical Corporation))(16ml/後肢、8ml/ダイアフラム)に加え、はさみで挽き、37℃の水浴中で攪拌(70rpm)しながら40分間インキュベートした。インキュベーション試料を500gで5分間遠心分離した後、ディスペーゼ(11U/ml、GIBCO)及びコラゲナーゼII(235U/mg)(1.5ml/後肢、0.5ml/ダイアフラム)を添加して酵素消化を誘導し、ペレットを再懸濁し、10mlの血清用ピペットで粉碎した。試料を37℃の水浴中で20分間攪拌(70rpm)した後、10mlのシリンジを使用して18及び19ゲージの針に通し、細胞懸濁液を単一細胞に機械的に解離した。試料を4℃で500gで10分間遠心分離し、ペレットを再懸濁し、40µmのナイロンセルストレーナー(Euroclone)を通して濾過し、遠心分離し(500g、4℃で10分間)、次いで洗浄培地中で再懸濁した。細胞を回転ホイール(10rpm)上で45分間、4℃で一次抗体とともにインキュベートして、マクロファージ、線維脂質産生前駆細胞及び衛星細胞を標識した。使用した一次抗体のリストを、表2にまとめる。試料を洗浄し、APCストレプトアビジン(1:100、BioLegend)を添加し、試料を回転ホイール(10rpm)上で4℃で20分間インキュベートし、次いで洗浄し、選別緩衝液(洗浄培地+(1.5mMのEDTA、2%BSA、1%L-グルタミン、及び1%ペニシリン-ストレプトマイシンを有するPBS、1:1の比)中に再懸濁させた。試料を細胞ストレーナーキャップチューブ(Thermo Fisher Scientific)を通して最終的に濾過した。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 2. FACS単離筋細胞に使用した一次抗体。

抗体	会社	希釈
APC/Fire750 抗マウス CD45	BioLegend(103154)	1:100
APC/Fire750 抗マウス CD31	BioLegend(102434)	1:100
FITC 抗マウス F4/80	BioLegend(123107)	1:100
Brilliant Violet 421 抗マウス Ly-6A/E(Scal)	BioLegend(108127)	1:100
ビオチン抗マウス CD016(Vcam)	BioLegend(105704)	1:100

10

【0192】

FACS ARIA (商標) II細胞選別機 (BD Biosciences) を使用して、細胞集団を分離した。前方散乱 (FSC) 及び側方散乱 (SSC) としての物理的パラメータを、細胞塊、破片、死細胞を除外し、単一細胞を単離するために使用した。衛星細胞を、抗CD31、抗CD45、抗Scal抗体を用いた陰性選択及び抗Vcam抗体を用いた陽性選択によって精製し、線維性脂肪原性前駆体を、抗CD31及び抗CD45抗体を用いた陰性選択及び抗Scal抗体を用いた陽性選択によって精製し、マクロファージを、抗CD45及び抗F4/80抗体を用いた陽性選択によって精製した。Pax7CreER/WT; R26RYFP/WT; mdx4Cvマウスから採取した試料において、衛星細胞を、YFP+ve細胞集団を単離することによって精製した。ソーティング後、細胞をRNA抽出及びRT-PCRのために処理した。

20

【0193】

リアルタイムPCR

RNA抽出の前に、筋肉を解剖し、瞬間冷凍した。瞬間凍結した筋肉を、液体窒素下でドライアイス上でモルタルとペストルを使用してホモジナイズした。総RNAを、TRIzol (登録商標) 試薬 (Invitrogen) を製造業者の指示に従って使用して、筋肉及びFACS単離細胞から抽出した。RNAを、NanoDrop分光光度計を使用して定量化し、製造業者の指示に従って、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して逆転写した。遺伝子発現を、SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 及びC1000 Touch thermocycler-CFX96 Real Time System (Biorad) を使用して定量的RT-PCRによって測定した。RT-PCRに使用されるサーモプロトコルを表3に示す。エクソン-エクソン接合部にまたがるプライマーを使用した (表4)。標準物質としてマウスHPRT (ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ) mRNAレベルを使用して、各転写産物のレベルを測定した。

30

40

50

【表 5】

表 3. RT-PCRサーモプロトコル

ステップ	温度(°C)	時間(分)
1	50.0	2.00
2	95.0	5.00
3	95.0	0.15
4	60.0	1.00
5	72.0	0.30(プレート読み取り)
6	ステップ 3 に進む(39x)	
7	65.0 - 95.0	0.05~0.5(プレート読み取り)

10

20

30

40

50

【表 6】

表 4. SYBER Green RT-PCRのプライマーリスト

遺伝子	順方向プライマー	逆方向プライマー	T _{Ann}	エクソン-エクソン接合部にまたがるか?
mAxin2	Cagagggacaggaaccactc (配列番号 73)	Tgccagtttcttggtctt (配列番号 48)	60°C	あり
mC1qa	Tctcagccattcggcagaac (配列番号 49)	Tggttggtgaggacctgtca (配列番号 50)	60°C	なし
mCol1a1	Tccggctctgctctctta (配列番号 51)	Gtatgcagctgacttcagggatgt (配列番号 52)	60°C	あり
mCol3a1	Gccacagccttctacac (配列番号 53)	Ccagggtcaccattctc (配列番号 54)	60°C	あり
mFn1	Tgcctcgggaatggaag (配列番号 55)	Atggtaggtcttccatcgata (配列番号 56)	60°C	あり
mLGR5	Tgccttcccaggctccttc (配列番号 57)	Gccgtggtccacaccccgat (配列番号 58)	60°C	あり
mTGFβ2	Cgagcggagcgacgaggagt (配列番号 59)	Tggcggggatggcatttcgg (配列番号 60)	60°C	あり
mHPRT	Aactggaagaatgtcttgattgt (配列番号 61)	Gaatttcaaatccaacaagtctgg (配列番号 62)	60°C	あり
mC1qb	Gggaatccactgctgtccggc (配列番号 63)	Ctcagcctcaggggttctgt (配列番号 64)	60°C	あり
mC1qc	Agagccaggaatcccagcgtcc (配列番号 65)	Gcatgccagctcgccctt (配列番号 66)	60°C	なし
mC1r	Aacatattacaagatgctgacca (配列番号 67)	Ccttgggctgtgcaggta (配列番号 68)	60°C	あり
mC1s	Gaccagaggcaggagaggaggc (配列番号 69)	Gctcagtgacaccttcaggagc (配列番号 70)	60°C	あり
mHPRT	Tcagaccgttttgccgcga (配列番号 71)	Atcgctaatcacgacgtgggac (配列番号 72)	60°C	なし

【0194】

クレアチンキナーゼ試験

生後約3ヶ月のC1qaKO; mdx^{4Cv}及びPax7^{CreER}; R26^{YFP}; mdx^{4Cv}マウスから採取した血清試料に対して、殺前にクレアチンキナーゼ試験を行った。クレアチンキナーゼ活性アッセイキット(比色法)(Abcam, 155901)を、製造業者の指示に従って分析に使用した。

【0195】

免疫蛍光

筋肉切片を、当該技術分野で知られるように、免疫蛍光のために処理した。手短に言え

ば、解剖した筋肉を0.5%のパラホルムアルデヒドを用いて4時間固定した後、一晚30%のスクロースに移し、最適切削温度化合物(OCT)中で凍結させ、8 μ mで凍結切除した。この取得作業は、モノクロカメラ(AxioCam 503 mono D)を備えたZeiss Axio Observer Z1光学顕微鏡を使用して行った。抗アキシン2(ab32197、1:20)及び抗C1q(ab11861、1:50)を一次抗体として使用した。Alexa Fluor 488/594(Thermo Fisher Scientific)を二次抗体として用いた。

【0196】

Zen2ソフトウェア(Zeiss)を免疫蛍光解析に使用した。筋肉の再生領域内の1017 μ m²の106以上のランダムに選択された領域における各生物学的複製について、C1q及びアキシン2の平均画素強度を測定した。二次抗体でのみ染色した切片で測定した背景ピクセル強度を差し引いた。正規または非正規のデータセット分布、スピアマン(r)、及びピアソン係数(r)を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して決定した。

【0197】

統計分析

特に明記しない限り、本明細書に提示された実験を少なくとも3回繰り返した。特に明記しない限り、データは平均値 $\pm$ SEMとして提示する。統計解析は、GraphPad Prism 8を使用して行った。多重比較のために一元配置分散分析(one-way ANOVA)検定を実施し、2つの群間の比較のためにパラメトリックスチューデントt検定を実施した。生物学的複製の数及び特定の試験の使用を、各図の凡例で示す。統計的有意性をp値(p)で表した： $p > 0.05$: ns ; $p \leq 0.05$: * ; $p \leq 0.01$: ** ; $p \leq 0.001$: *** 及び $p \leq 0.0001$: ****。

【0198】

組織の溶解

(嗅球及び小脳を含まない)脳を、1:10w/vのBupH(商標)トリス緩衝生理食塩水(Thermo Scientific 28379)+プロテアーゼ阻害剤カクテル(Thermo Scientific A32963)+10mM EDTA)中で、Qiagen TissueLyser中の7mmのスチールビーズで2分間、30Hzでホモジナイズすることによって溶解させた。次いで、溶解物を17,000 $\times$ gで20分間スピニングした。上清をELISAアッセイに使用した。総タンパク質を、Pierce(商標)BCAタンパク質アッセイキット(ThermoFisher 23225)を使用して測定した。

【0199】

PK及び補体の分析

遊離抗C1qブロッキングマウス抗体、遊離C1q、総C1q、C1s、C4、C2、C3、及び活性化マーカーC1q-C3d複合体、C1s-C1inh複合体、及びC3dのレベルを、サンドイッチELISAを使用して、血漿及び組織溶解物中で測定した。黒色の96ウェルプレート(Costar #3925)を、重炭酸緩衝液(pH9.4)中の75 μ Lのそれぞれの捕捉抗体(表5)で4Cで一晩被覆した。翌日、プレートをdpBS pH7.4(ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水)で洗浄し、次いで3%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有するdpBS緩衝液でブロッキングした。アッセイ緩衝液(0.3%BSA、0.1%Tween 20、10mM EDTAを含有するdpBS)中の精製タンパク質で標準曲線を作成した。試験用の血清または血漿サンプルをそれぞれの希釈でアッセイ緩衝液中で調製した。ブロッキング緩衝液をタッピングによってプレートから除去した。標準及びサンプルを1ウェル当たり75 μ Lで二連で添加し、PK測定のために300rpmで室温で1時間振盪しながらインキュベーションし、その後、他のアッセイのために4Cで一晩インキュベーションした。プレートを洗浄緩衝液(0.05%Tween 20を含有するdpBS)で3回洗浄し、75 μ Lのアルカリホスファターゼコンジュゲート二次抗体(表5)を全てのウェルに添加した。プレートを室温で振盪しな

から1時間インキュベーションした。プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄し、75 μ Lのアルカリホスファターゼ基質（Life Technologies, T2214）を使用して発色させた。室温で20分後、プレートをルミノメーターを使用して読み取った。標準を4PLロジスティックフィットを使用してフィッティングし、未知の濃度を決定した。分析物レベルを希釈について補正し、次いでGraphPad Prismを使用してプロットした。

【表7】

表5. ELISAアッセイで使用した標準及び抗体

アッセイ	捕捉	二次	血漿希釈倍率	組織希釈倍率
PK	ヒト C1q(Complement Tech A100)	ヤギ抗マウス IgG(JacksonImmuno 115-055-071)	300000	1000
C1q フリー	抗 C1q(JL1、abcam71940)	抗 C1q-AP(Annexon)	15000	30
C1q 合計	抗 C1q(JL1、abcam71940)	抗 C1q-AP(7H8、abcam11861)	1000	
C1s	ポリクローナル抗 C1s(Annexon)	ポリクローナル抗 C1s-AP(Annexon)	1000	10
C4	抗 C4(LSBio C374031)	抗 C4-AP(Invitrogen MA1-40047)	300	
C2	ポリクローナル抗 C2(Annexon)	ポリクローナル抗 C2-AP(Annexon)	100	
C3	抗 C3d(Dako A063)	抗 C3-AP(MPBio0855444)	1000	300
C3d	抗 C3d(Dako A063)	抗 C3-AP(Novus Bio NB200-540)	1000	30
C1q-C3d 複合体	抗 C1q(Dako A0136)	抗 C3d-AP(Annexon)	500	10
C1s-C1inh 複合体	モノクローナル抗 C1s(Annexon)	モノクローナル抗 C1inh-AP(Annexon)	100	10
アルブミン	abcam210890 キット			50000

【0200】

実施例2：野生型、ジストロフィー型及び高齢野生型マウスの骨格筋における補体レベルの評価

古典的補体タンパク質C1q、C3及びC3dのレベルを、約1歳の野生型、約2歳の野生型及び約1歳のmdx^{4Cv}マウスの横隔膜、大腿四頭筋及び前脛骨でELISAを通して評価した。

【0201】

図1：年齢適合対照（約1歳）と比較して、mdx^{4Cv}マウスの脛骨前部において、C1q、C3及びC3dのレベルの増加が観察され、約1歳の野生型と比較して、約2歳

のマウスの脛骨前部において、C 1 q のレベルの増加が観察された。年齢適合対照（約 1 歳）と比較して、mdx^{4Cv}マウスの横隔膜においてC 1 q、C 3 及びC 3 d のレベルの増加を示唆する傾向が観察された。C 1 q レベルは、年齢マッチングされた対照（約 1 歳）と比較して、mdx^{4Cv}マウスの大腿四頭筋で増加し、C 3 及びC 3 d レベルの両方が同様の傾向を示している。最後に、C 1 q 及びC 3 レベルの増加を示唆する傾向が、約 1 歳の野生型と比較して、約 2 歳のマウスの大腿四頭筋において観察された。

【0202】

古典的補体タンパク質C 1 q、C 1 s、C 3、C 3 d 及びC 4 のレベルを、約 1 ヶ月、約 3 ヶ月及び約 1 歳の野生型ならびにmdx^{4Cv}の横隔膜、大腿四頭筋及び脛骨前部におけるELISAを通して評価した。重要なことに、評価を筋肉に限定し、血清タンパク質成分を分析から除外することを目的として、筋肉解離及びELISAの前に、マウスにPBSを灌流した。C 1 q、C 1 s、C 3、C 3 d 及びC 4 は、分析した全ての野生型及びmdx^{4Cv}筋肉で発現した。

【0203】

図 2 及び 3：C 1 q、C 1 s、C 3 及びC 3 d タンパク質発現は、横隔膜、大腿四頭筋及び前脛骨における野生型と比較して、約 1 ヶ月、約 3 ヶ月及び約 1 歳のジストロフィー性筋肉においてより高く、ほとんどの場合において統計的有意性に達した。C 4 タンパク質の発現は、野生型と比較して約 1 ヶ月齢のマウスのジストロフィー性脛骨前部及び大腿四頭筋において、野生型と比較して約 3 ヶ月齢のジストロフィー性マウスの横隔膜において、及び野生型と比較して約 1 歳のジストロフィー性マウスの脛骨前部において、より高かった。

【0204】

実施例 3：野生型及びジストロフィー性マウスにおける行動試験

行動試験は、補体タンパク質発現について分析した同じ野生型及びジストロフィー性の約 1 ヶ月、約 3 ヶ月及び約 1 歳のマウスで実施した（図 2 及び 3）。以下の機能パラメータを評価した：1）疲労前の最大ぶら下がり時間、4 肢ぶら下がりワイヤー試験によって評価；

2）移動した総距離、平均速度、及び移動時間のパーセンテージを、オープンフィールド試験によって評価。

【0205】

図 4：野生型及びジストロフィー性マウスは、健康な対照と比較してmdxマウスで発生する報告された運動障害と一致して、筋肉解離の前に実施された行動試験及びELISAにおいて、示差的な筋抵抗を示した。ジストロフィー性マウスは、約 3 ヶ月及び約 1 歳での年齢適合野生型と比較して、4 肢ぶら下げワイヤー試験における抵抗性が低かった。オープンフィールド試験では、約 3 ヶ月齢のジストロフィー性マウスは、野生型と比較して、より低い速度で短い距離を歩き、より多くの不動時間を費やしたが、約 1 ヶ月齢及び約 1 歳のジストロフィー性マウスと年齢適合野生型と比較して、差は観察されなかった。

【0206】

実施例 4：インビボでの抗C 1 q ブロッキング抗体の有効性の評価

Pax7^{CreER}；R26^{YFP}；mdx^{4Cv}マウスを抗C 1 q ブロッキング抗体または対照抗体で処理した。機能パラメータ（すなわち、疲労及び運動活動の前の最大時間）を評価するために、処理の前後に行動試験を実施した。補体レベル及びクレアチンキナーゼレベルを評価するために、処理の前後に血液試料を採取した。殺の後、補体レベル及び遺伝子発現解析を行うために、組織（すなわち、後肢筋肉、横隔膜、肝臓及び心臓）を採取した。抗C 1 q ブロッキング抗体処理のために用いた実験計画を図 5 に示す。

【0207】

行動試験及び試料（すなわち、血液及び組織）採取を、C 1 q a の発現が骨髄細胞株において条件的に除去されるC 1 q a^{KO}；mdx^{4Cv}マウスでも実施した。C 1 q a^{KO}；mdx^{4Cv}マウスの検証を図 6 に示す。

【0208】

実施例 5：抗 C1q ブロッキング抗体で処理した C1qa^{KO}；mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィーマウスにおける行動試験

約 1 ヶ月、約 2 ヶ月及び約 3 ヶ月齢の C1qa^{KO}；mdx^{4Cv} マウスに対して、疲労前の最大ぶら下がり時間（4 本の四肢ぶら下がりワイヤー試験を介して）、走行した総距離、平均速度、及び移動時間のパーセンテージ（オープンフィールド試験を介して）を評価するために、行動試験を行った。

【0209】

同じ行動試験を、Pax7^{CreER}；R26^{YFP}；mdx^{4Cv} マウスに対して、処理の前後に抗 C1q ブロッキング抗体または対照抗体で処理した。

【0210】

図 7～10：生後約 1 ヶ月（すなわち、生後 31 日目～36 日目の試験の初日）で、4 肢ぶら下がりワイヤー試験の対照と比較して、C1qa^{KO}；mdx^{4Cv} マウスにおける物理的抵抗の改善を示唆する傾向を観察した。同じ傾向が約 2 ヶ月齢（すなわち、生後 67～69 日目の試験の初日）で観察されたが、マウスが約 3 ヶ月齢（すなわち、生後 79～81 日目の試験の初日）で試験されたときには、もはや観察されなかった。試験した時点（すなわち、約 1 ヶ月、約 2 ヶ月及び約 3 ヶ月）のいずれにおいても、オープンフィールド試験における対照と比較して、C1qa^{KO}；mdx^{4Cv} マウスにおいて差別的な運動活性は観察されなかった。

【0211】

抗 C1q ブロッキング抗体で処理したジストロフィー性マウスは、4 肢ぶら下がりワイヤー試験で対照抗体で処理したマウスと比較して、高い身体的抵抗性を生じさせた。対照と比較して、抗 C1q ブロッキング抗体で処理したジストロフィー性マウスにおいて、オープンフィールド試験パラメータ（すなわち、総距離、平均速度、及び移動時間のパーセンテージ）において差は観察されなかった。注目すべきことに、行動試験は、処理前及び処理後の生後約 2.5 ヶ月（すなわち、生後 67 日目の試験の初日）及び生後約 3 ヶ月（すなわち、生後 81 日目の試験の初日）に、これらの動物でそれぞれ実施した（図 5）。

【0212】

実施例 6：抗 C1q ブロッキング抗体で処理した C1qa^{KO}；mdx^{4Cv} マウス及びジストロフィー性マウスにおける正準 Wnt 標的遺伝子及び線維原性遺伝子の遺伝子発現評価

本実施例では、C1q 枯渇が正規の Wnt 経路の発現の低下をもたらしたかどうか及び／または線維化レベルの低下をもたらしたかどうかを評価するために、抗 C1q ブロッキング抗体で処理した C1qa^{KO}；mdx^{4Cv} マウス及び Pax7^{CreER}；R26^{YFP}；mdx^{4Cv} マウスから単離された筋肉及び単一細胞における遺伝子発現分析を行った。正規の Wnt 標的遺伝子（すなわち、Tgfβ2、Lgr5 及び Axin2）及び線維原性遺伝子（すなわち、コラーゲン 1a1、コラーゲン 3a1 及びフィブロネクチン）の mRNA レベルを、抗 C1q ブロッキング抗体で処理された C1qa^{KO}；mdx^{4Cv} マウス及び Pax7^{CreER}；R26^{YFP}；mdx^{4Cv} マウスの筋肉（すなわち、腓腹筋及び横隔膜）ならびに単離された単一細胞（すなわち、線維性／脂肪原性前駆細胞及び衛星細胞）で評価した。

【0213】

図 11～14：全体として、対照と比較して、C1qa^{KO}；mdx^{4Cv} 筋及び単一細胞における Wnt 標的遺伝子（すなわち、Tgfβ2、Lgr5 及び Axin2）または線維原性遺伝子（すなわち、コラーゲン 1a1、コラーゲン 3a1 及びフィブロネクチン）のいずれかの低下した発現は観察されなかった。

【0214】

また、対照と比較して、抗 C1q ブロッキング抗体で処理された Pax7^{CreER}；R26^{YFP}；mdx^{4Cv} マウスの筋肉及び単一細胞において、Wnt 標的遺伝子（すなわち、Tgfβ2、Lgr5 及び Axin2）または線維原性遺伝子（すなわち、コラーゲン 1a1、コラーゲン 3a1 及びフィブロネクチン）のいずれかの低下した発現は

10

20

30

40

50

観察されなかった。

【0215】

図27は、抗C1q、抗Axin2抗体、及びHoechstで染色した約1歳のmdx^{4Cv}の腓腹筋の代表的な免疫蛍光を示す。スケールバー（上部画像）。各領域におけるC1qとAxin2強度値との間の正の相関を示した。

【0216】

実施例7：C1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウス由来、及び抗C1qブロッキング抗体で処理したジストロフィー性マウス由来の血清におけるクレアチンキナーゼ試験

血清クレアチンキナーゼ（CK）レベルは、ジストロフィーマウスにおける筋肉損傷の指標として、及びDMDの診断バイオマーカーとして一般的に使用される。C1qの枯渇がCKレベルの低下をもたらしたかどうかを評価するために、C1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウス及びPax7^{CreER}；R26R^{YFP}；mdx^{4Cv}マウスにおいて、抗C1qブロッキング抗体で処理したCK活性を測定した。CK試験は、殺（約3ヶ月齢）後に採取された血清サンプルを使用して、両方のケースで実施した。

10

【0217】

図15：対照と比較して、C1qa^{KO}；mdx^{4Cv}血清におけるCK活性の低下を示唆する傾向を観察した。

【0218】

本実施例では、C1qブロッキング抗体及び対照抗体で処理した後のPax7^{CreER}；R26R^{YFP}；mdx^{4Cv}マウスにおけるCK活性の低下を示唆する傾向を観察した。しかしながら、処理前に同じ試料で測定された異なるCK活性レベル（図15BのCntr（プレ）及び抗C1q（プレ）、おそらく同様）は、生物学的変動性を示唆する。

20

【0219】

実施例8：C1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウス及び抗C1qブロッキング抗体で処理したジストロフィーマウスから採取した血漿及び筋肉における補体レベル評価

C1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウス及び抗C1qブロッキング抗体で治療したジストロフィー性マウスから採取した血漿中及び組織中の補体レベルを評価するために、ELISAアッセイを行った。古典的補体タンパク質（すなわち、C1q、C3d及びC1s）、C1q-C3d免疫複合体（IC）及びC1s-C1阻害剤複合体（C1sC1inh）のレベルを、C1qa^{KO}；mdx^{4Cv}マウスから採取した血漿、横隔膜、腓腹筋及び肝臓、ならびに抗C1qブロッキング抗体で治療したジストロフィー性マウスから評価した。抗C1qブロッキング抗体で処理したジストロフィー性マウスから採取した試料において、試料中に存在する薬物レベルも評価した（PK）。更に、抗C1qブロッキング抗体で処理したジストロフィーマウスから採取した心臓試料中で、前述のタンパク質のレベルを全て評価した。

30

【0220】

図16～22：抗C1qブロッキング抗体処理に関して、抗C1qブロッキング抗体で処理したマウス（すなわち、血漿、横隔膜、腓腹筋、肝臓及び心臓）から採取した全ての試料中に見出される薬物レベルは、対照抗体で処理したマウスと比較して増加した。分析した試料中では、腓腹筋は薬物量が最も多い筋肉であり、心臓は薬物量が最も少ない筋肉であった。C1qタンパク質のレベルは、全ての分析された試料において、抗C1qブロッキング抗体による処理後に低下した。特に、C1q枯渇は、横隔膜、腓腹筋、及び肝臓において強く効果があり、抗C1qブロッキング抗体で処理されたマウスから採取された試料中のC1qレベルは、C1q遺伝的に切除されたマウス（すなわち、C1qa^{KO}；mdx^{4Cv}）から採取された試料中で検出されたレベルと同様であった。

40

【0221】

全体的に、他の試験されたタンパク質（すなわち、C3d、C1s）及びタンパク質複合体（すなわち、IC、C1sC1inh）のレベルにおいて、対照と比較して、抗C1qブロッキング抗体で処理したジストロフィー性マウスから採取した試料において、及び

50

C1q^{KO};mdx^{4Cv} 試料において、対照と比較して、差は観察されなかった。

【0222】

実施例9：野生型及びジストロフィーの骨格筋における補体レベルの評価

C1複合体サブユニットのレベル：C1qa、C1qb、C1qc、C1r、及びC1sを、約1歳の野生型及びmdx^{4Cv}後肢筋肉のmRNA発現を測定することによって評価した。C1qa及びC1qbの発現は、約1歳の野生型及びmdx^{4Cv}後肢筋から単離されたマクロファージにおいて測定された。

【0223】

図23及び26：C1複合体成分の発現は、ジストロフィー性筋肉において増強される。C1複合体サブユニットC1qa、C1qb、C1qc、C1r、C1sのmRNA発現は、約1歳の野生型(WT)及びmdx^{4Cv}(Mdx)マウスの後肢筋において測定した。

10

【0224】

図24A～24C：C1qサブユニットは、ジストロフィーマウスの骨格筋内にマクロファージを浸潤させることによって発現される。図24A～24Bは、約1歳の野生型(WT)及びmdx^{4Cv}(Mdx)の後肢筋肉から単離した衛星細胞(SC)、マクロファージ(MAC)及び線維性/脂肪原性前駆細胞(FAP)におけるC1qa(A)及びC1qb(B)発現のqPCR分析を示す。図24Cは、約1歳の野生型(WT)及びmdx^{4Cv}(Mdx)マウスの後肢筋における1mg当たりの組織当たりのマクロファージの数を示す。

20

【0225】

実施例10：抗C1qブロッキング抗体で処理したC1q^{KO};mdx^{4Cv}マウス及びジストロフィーマウスにおける行動試験

C1q^{KO};mdx^{4Cv}マウスについて、約1ヶ月、約2ヶ月及び約3ヶ月齢で行動試験を実施して、疲労前の最大ぶら下がり時間(4肢ぶら下がりワイヤー試験を通じて)、走行した総距離、平均速度、移動時間のパーセンテージ(オープンフィールド試験を通じて)、2肢の握力、及び回転ロッドの速度を評価した。

【0226】

同じ行動試験を、Pax7^{CreER};R26^{YFP};mdx^{4Cv}マウスに対して、処理の前後に抗C1qブロッキング抗体または対照抗体で処理した。

30

【0227】

図25A～25Iは、約1歳のC1q^{KO};mdx^{4Cv}マウス及び対照における行動試験を示す。図25Aは、約1歳のLyz^{Cre+/−}C1qa^{FL/FL};mdx^{4Cv}(C1qa^{KO})及びLyz^{Cre+/−}C1qa^{WT/WT};mdx^{4Cv}(C1qa^{WT})のマウス体重(グラム)を示す。図25B、25Cは、(図25A)のように、マウスに対して実施されたぶら下がり試験(HT)を示す。総ぶら下がり時間(図25B)及びマウス体重について正規化された総ぶら下がり時間(図25C)を評価した。図25D～25Fは、(図25A)のように、マウスに対して実施されたオープンフィールド(OF)試験を示す。総距離(cm)(図25D)、平均速度(cm/秒)(図25E)及び移動時間のパーセンテージ(図25F)を評価した。図25G、25Hは、(図25A)のように、マウスに対して行われた2つの脚のグリップ試験を示す。マウス体重に対して正規化された最大強度(図25G)及びマウス体重に対して正規化された総グリップ時間(図25H)を評価した。図25Iは、(図25A)のように、マウスで実施されたロータロッド試験を示す。マウス体重について正規化された総歩行時間を評価した。N=5(C1qa^{KO})、N=7(C1qa^{WT})、N=2(WT)。データを、SEMを用いて平均として表す。両側非対称t検定を適用した。p>0.05:ns;p≤0.05:*;p≤0.01:**;p≤0.001:***及びp≤0.0001:****。

40

【0228】

参照による組み込み

本明細書で引用される特許、公開された特許出願、及び非特許文献の各々は、それらの

50

全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0229】

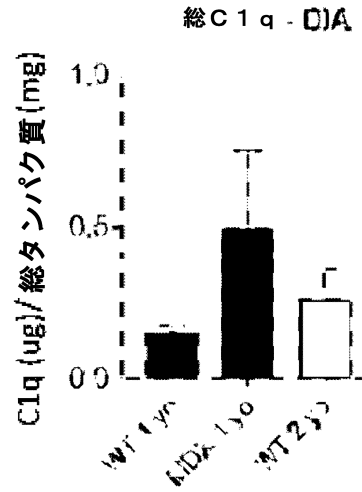
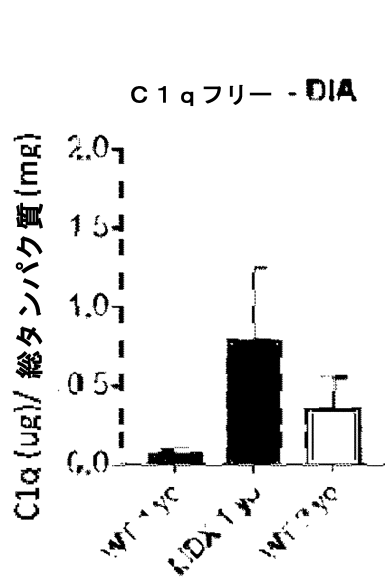
均等物

当業者らは、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識するか、または単なる通常の実験のみを使用して確認することができるであろう。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図されている。

【図面】

【図1A】

【図1B】

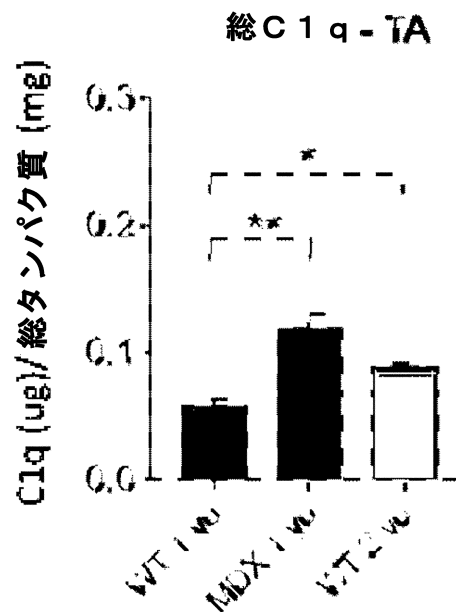
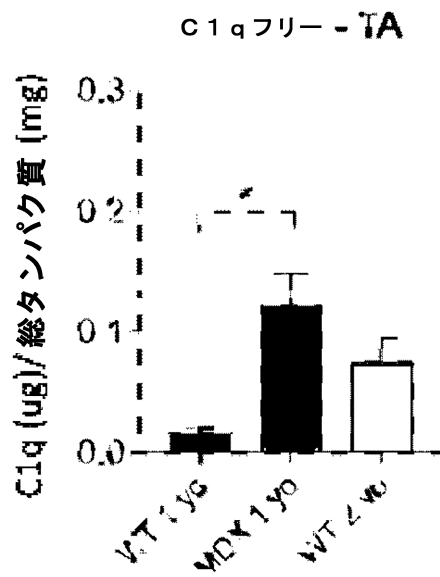


10

20

【図1C】

【図1D】

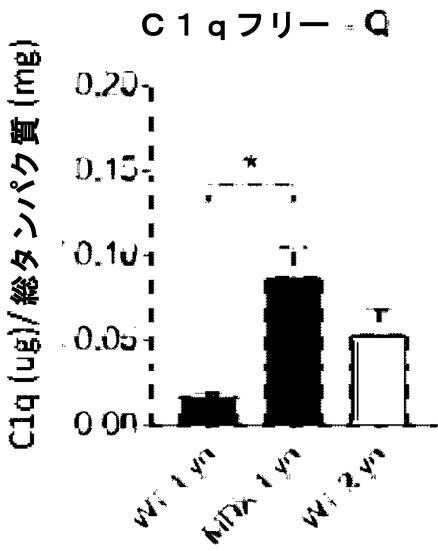


30

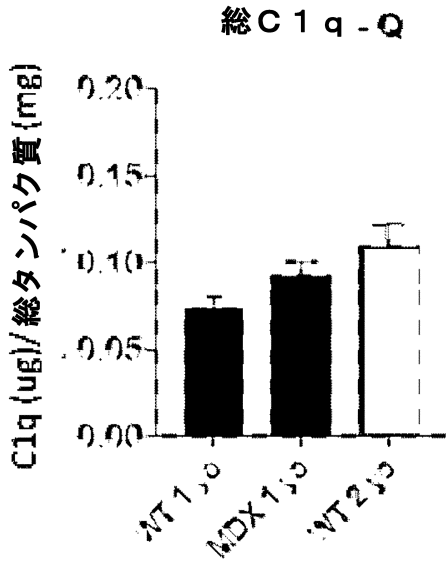
40

50

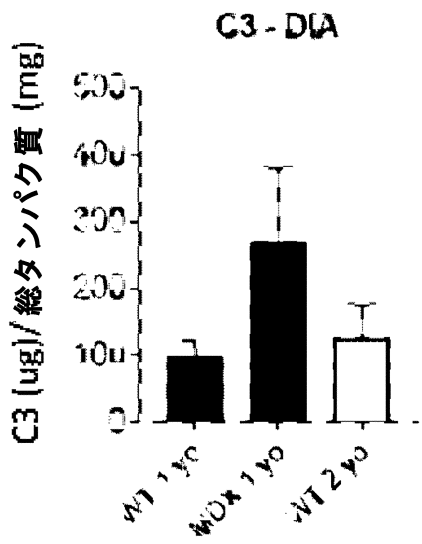
【図 1 E】



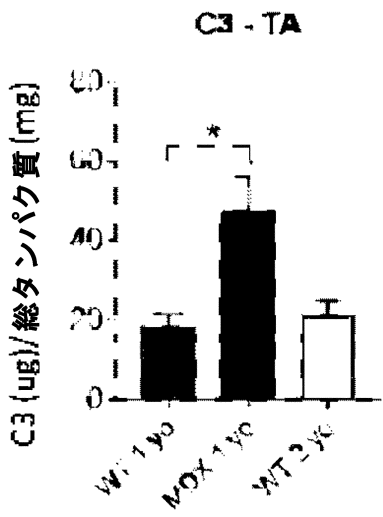
【図 1 F】



【図 1 G】



【図 1 H】



10

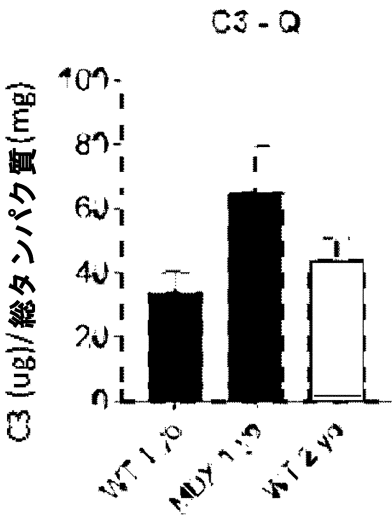
20

30

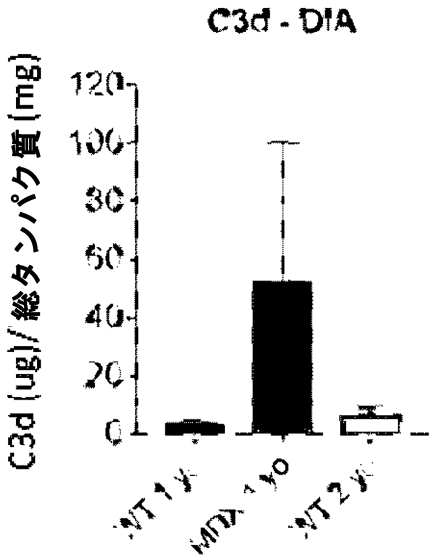
40

50

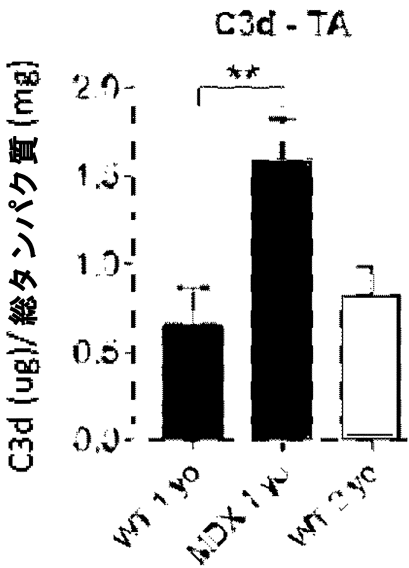
【図 1 I】



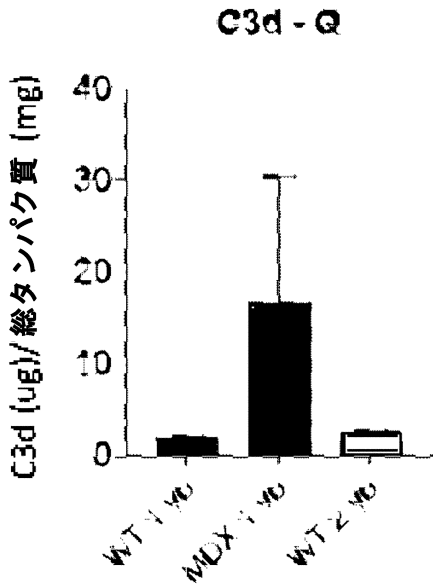
【図 1 J】



【図 1 K】



【図 1 L】



10

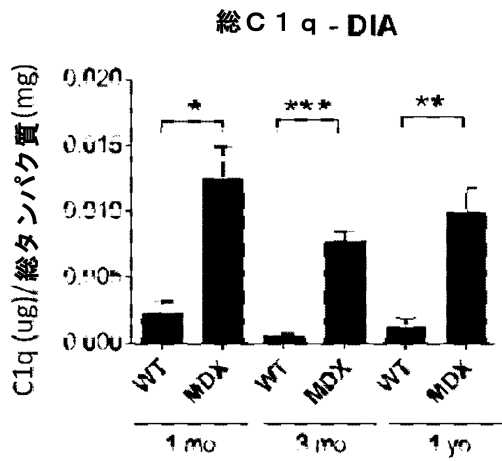
20

30

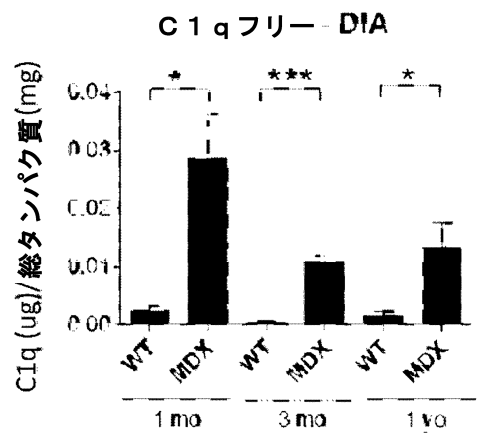
40

50

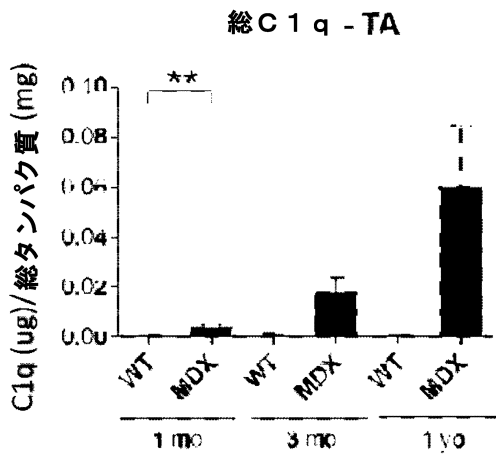
【図 2 A】



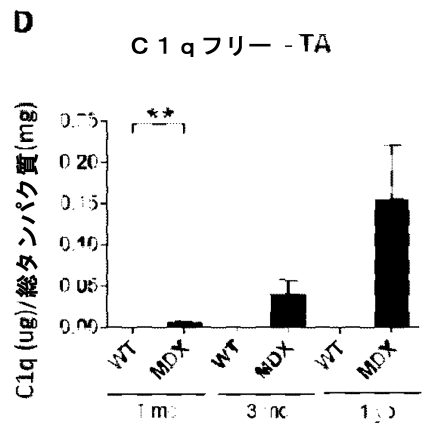
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



10

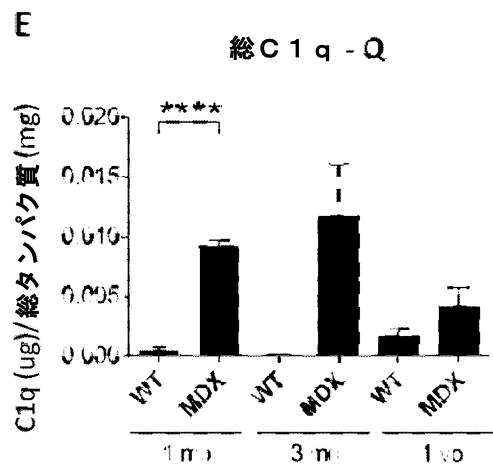
20

30

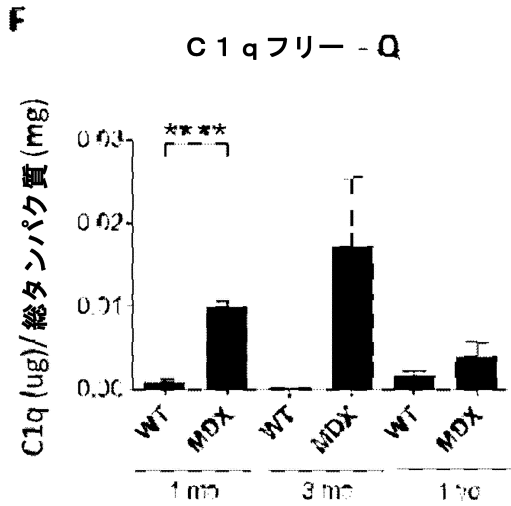
40

50

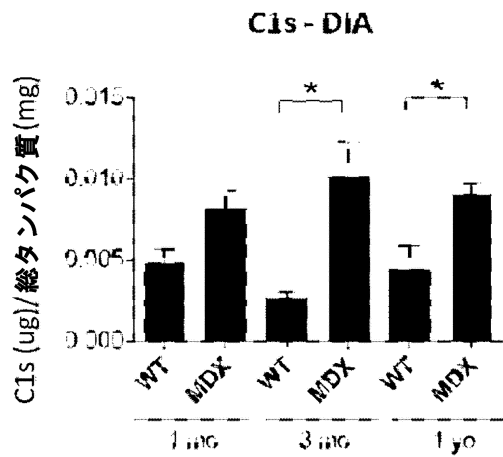
【図 2 E】



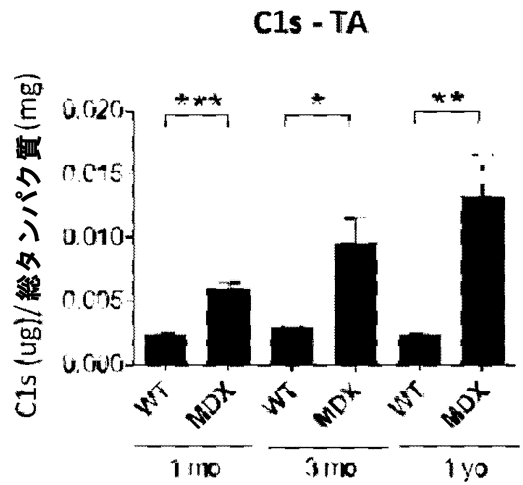
【図 2 F】



【図 2 G】



【図 2 H】



10

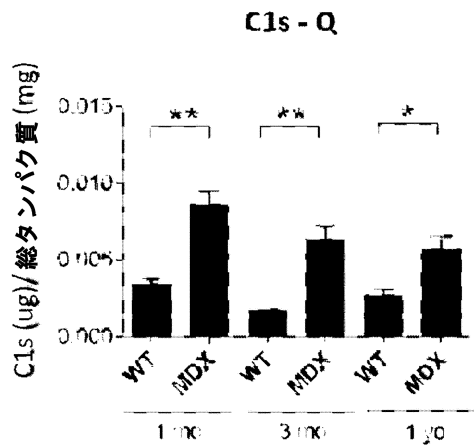
20

30

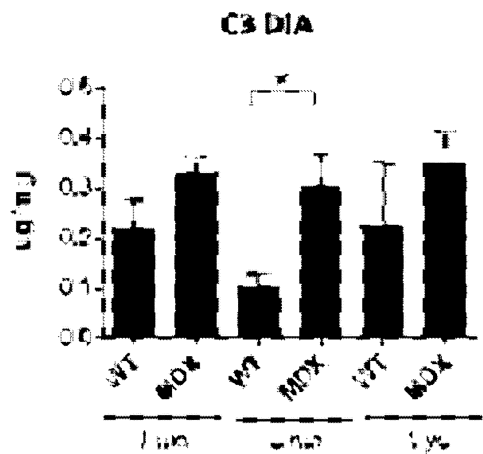
40

50

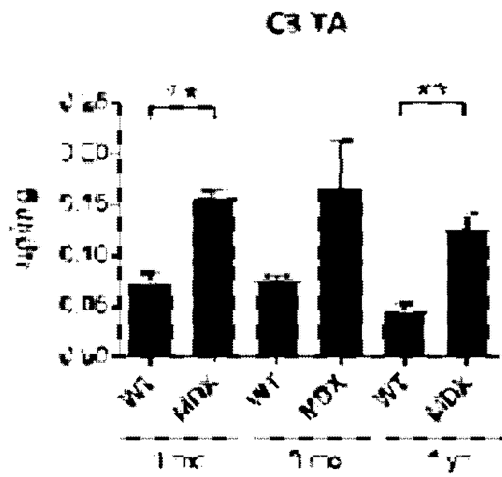
【図 2 I】



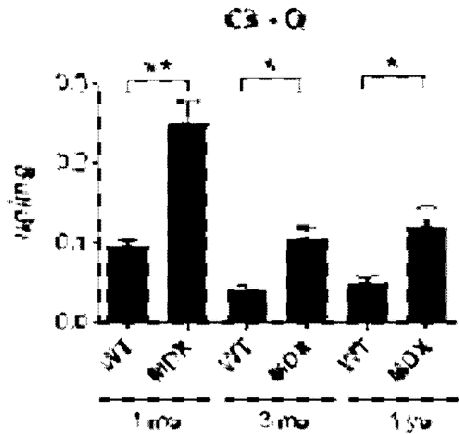
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 3 C】



10

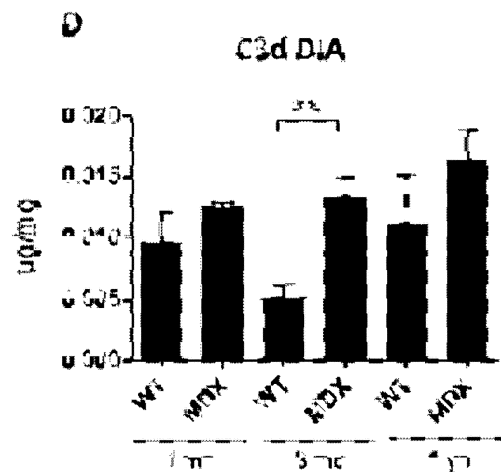
20

30

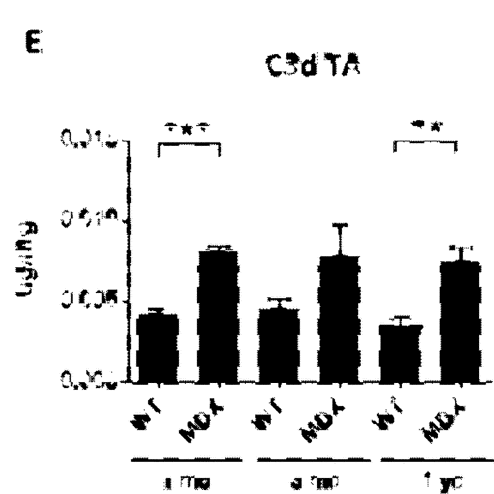
40

50

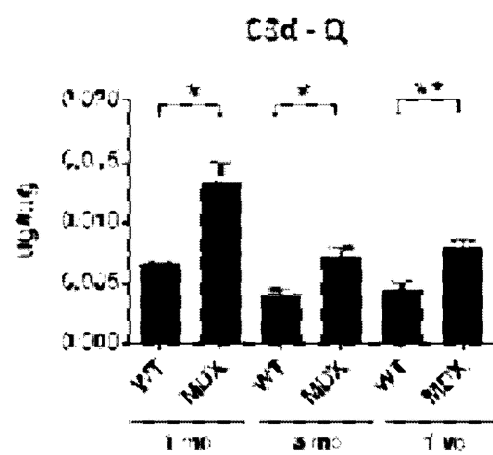
【図 3 D】



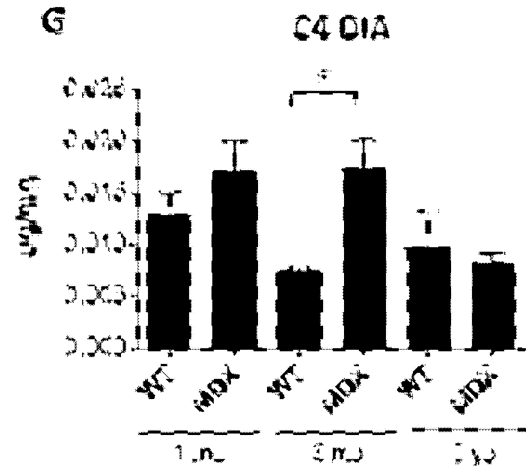
【図 3 E】



【図 3 F】



【図 3 G】



10

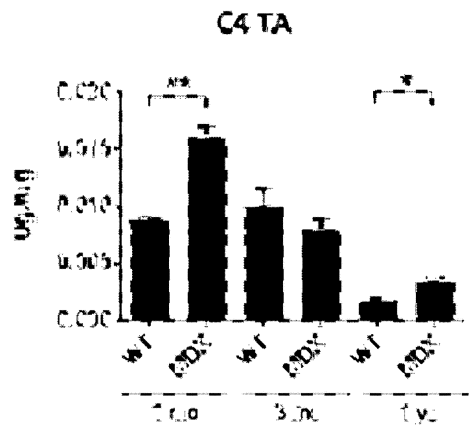
20

30

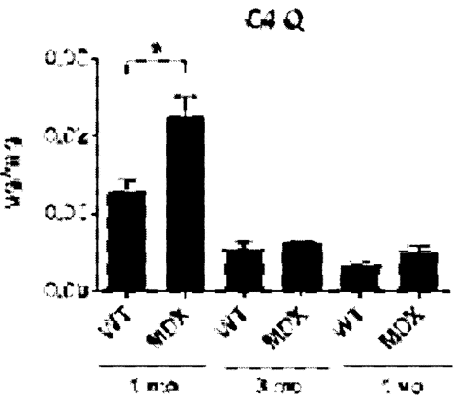
40

50

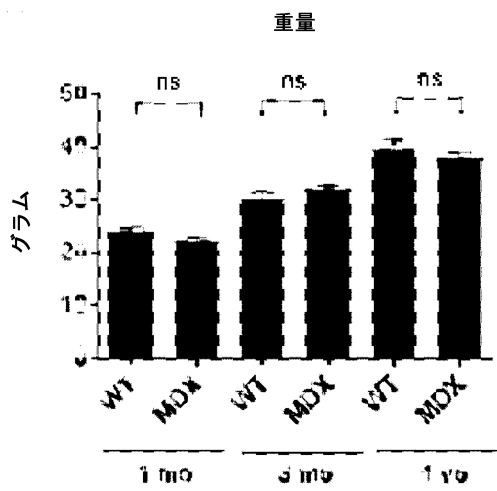
【図 3 H】



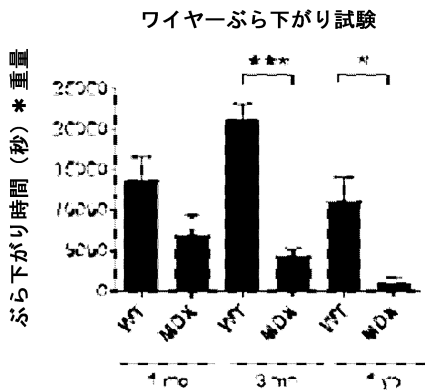
【図 3 I】



【図 4 A】



【図 4 B】



10

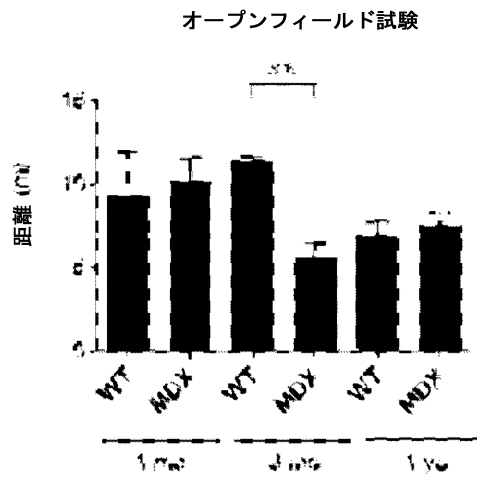
20

30

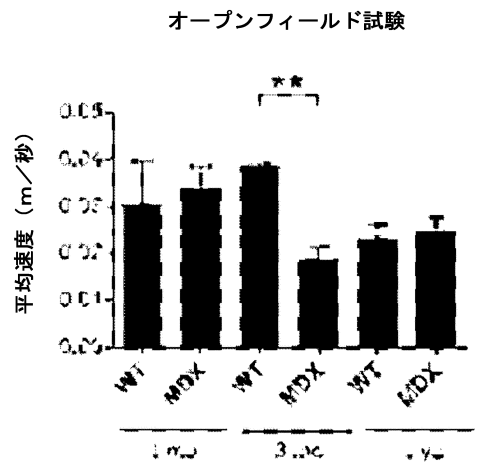
40

50

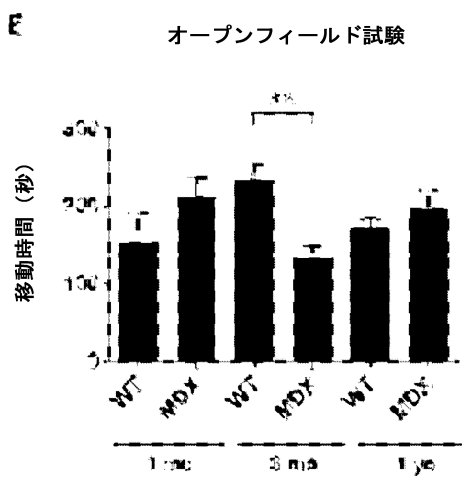
【図 4 C】



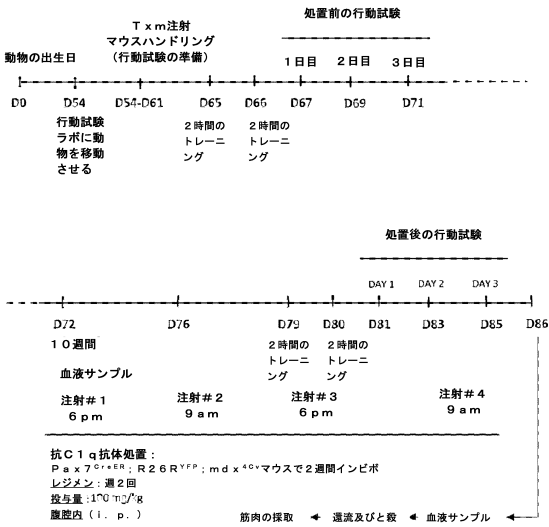
【図 4 D】



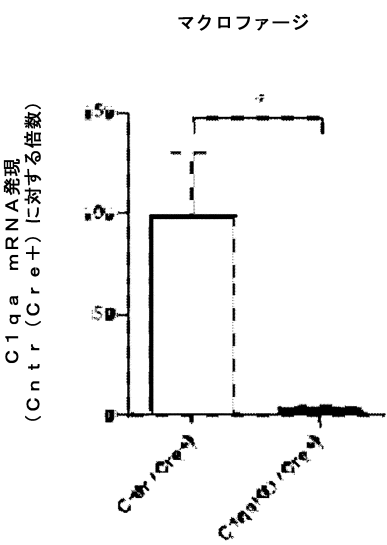
【図 4 E】



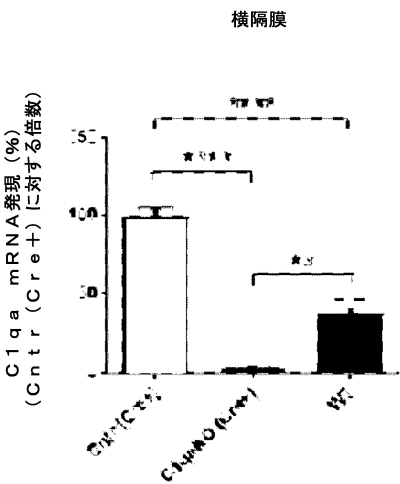
【図 5】



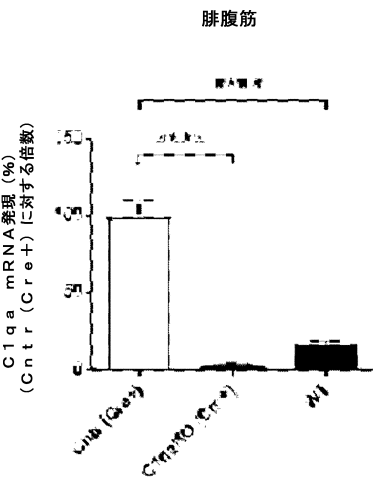
【図 6 A】



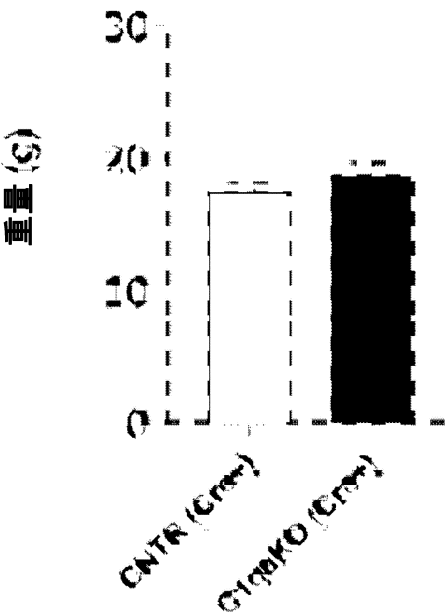
【図 6 B】



【図 6 C】



【図 7 A】



10

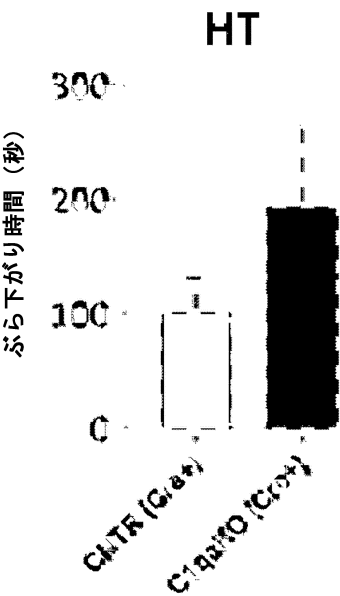
20

30

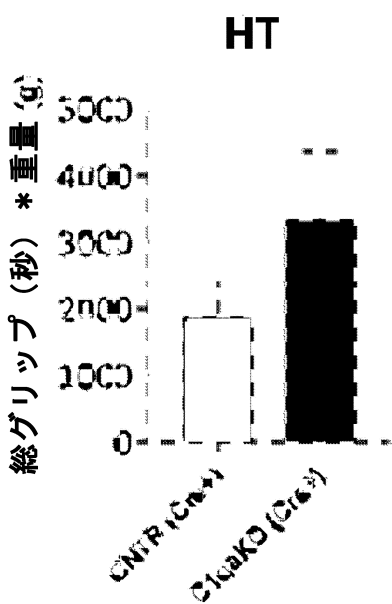
40

50

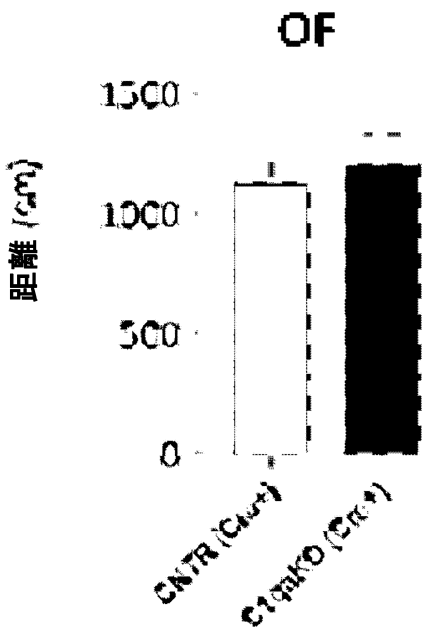
【図 7 B】



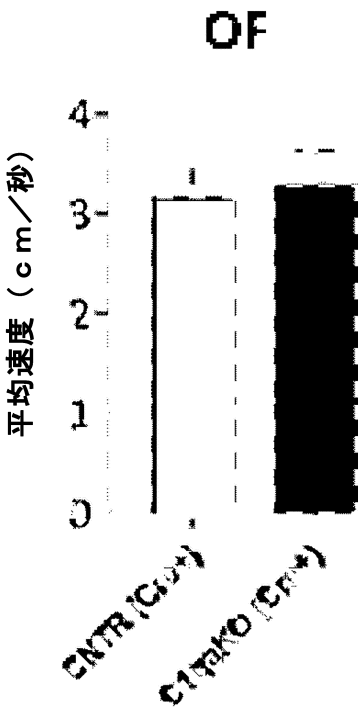
【図 7 C】



【図 7 D】



【図 7 E】



10

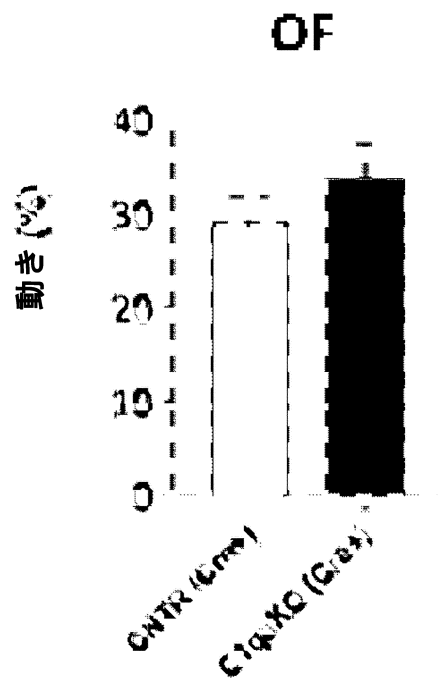
20

30

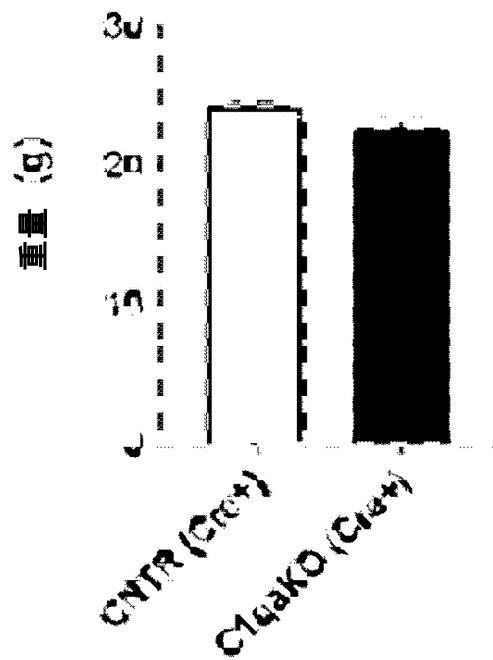
40

50

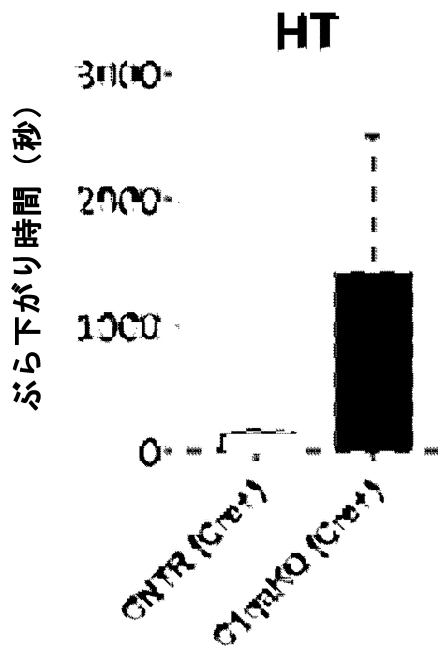
【図 7 F】



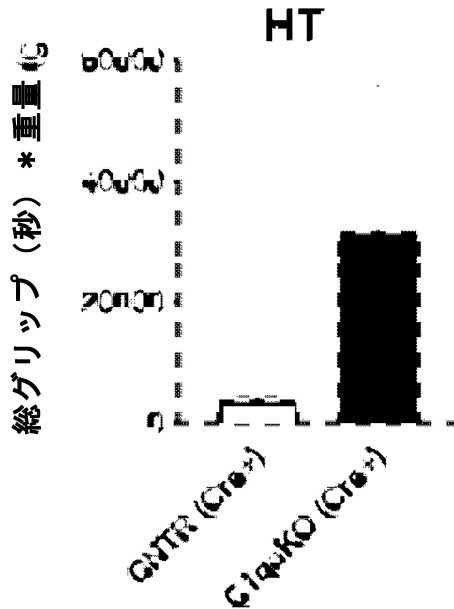
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



10

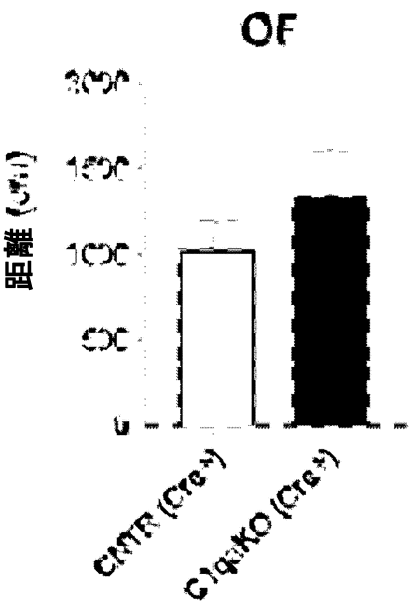
20

30

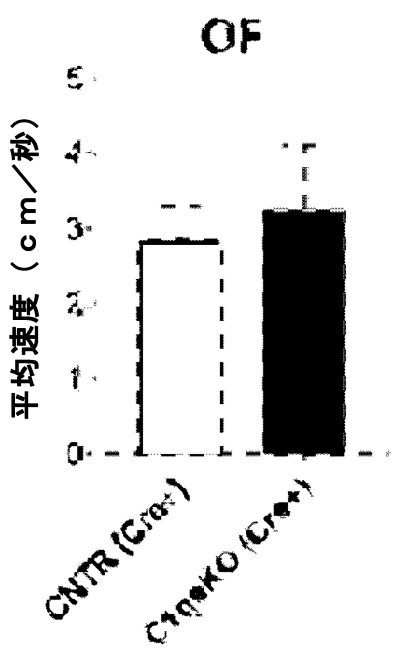
40

50

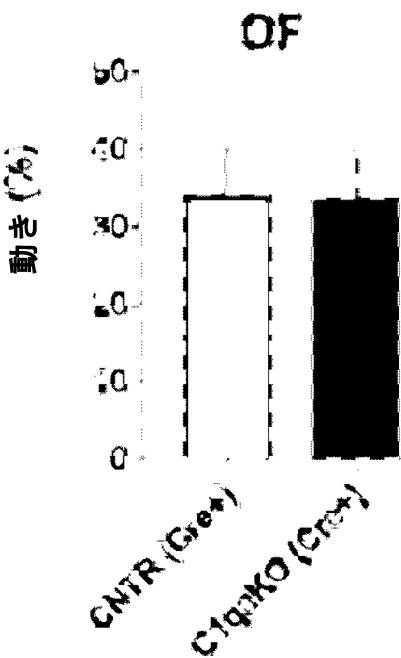
【図 8 D】



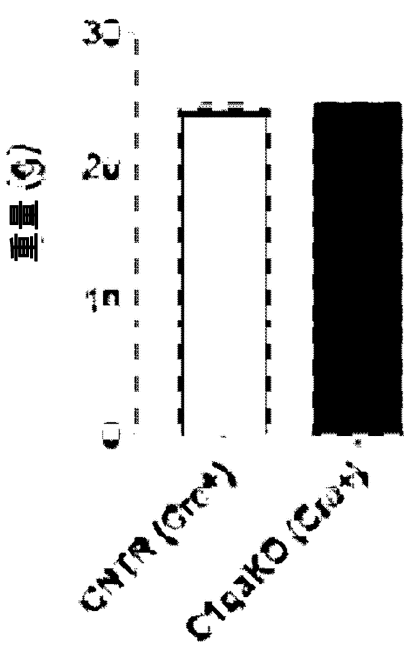
【図 8 E】



【図 8 F】



【図 9 A】



10

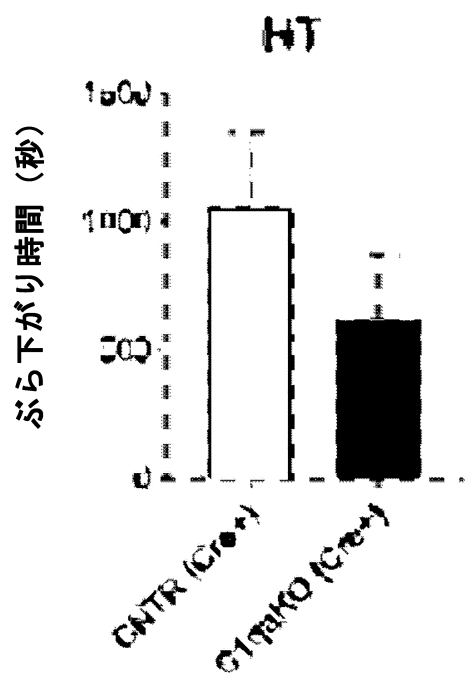
20

30

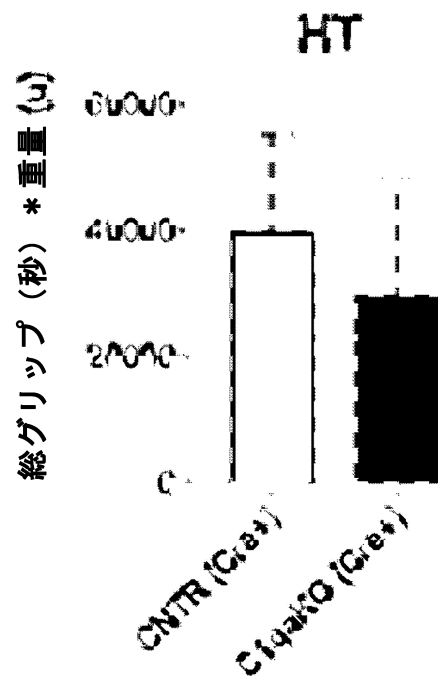
40

50

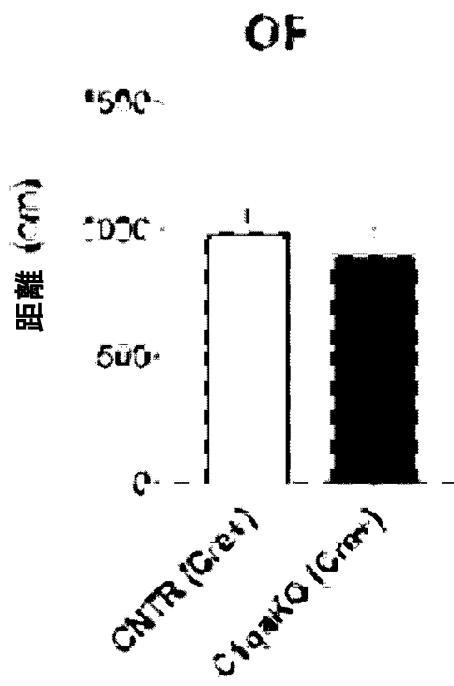
【図 9 B】



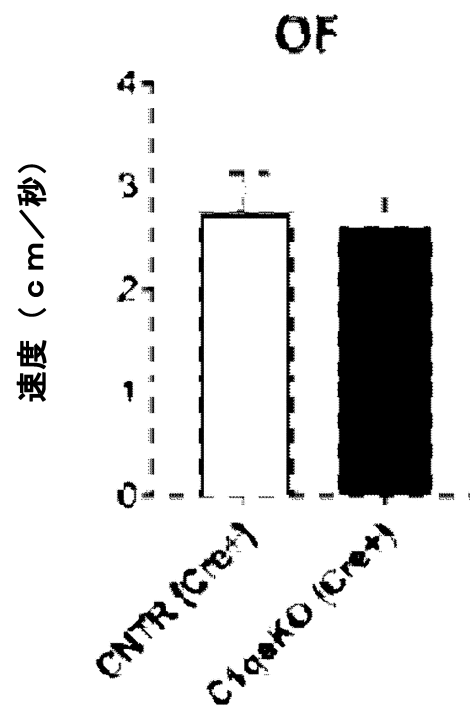
【図 9 C】



【図 9 D】



【図 9 E】



10

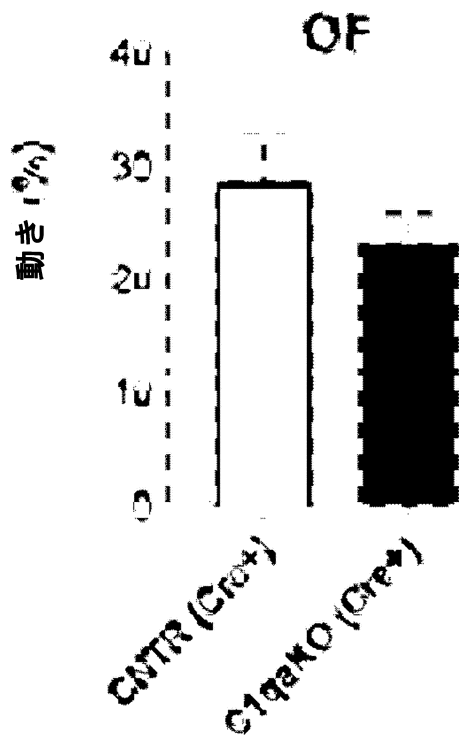
20

30

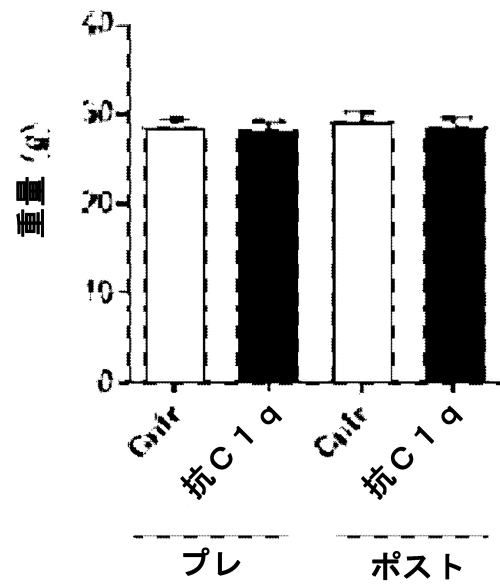
40

50

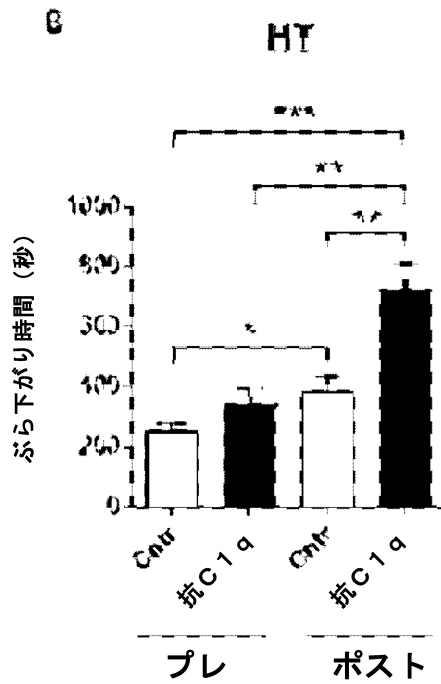
【図 9 F】



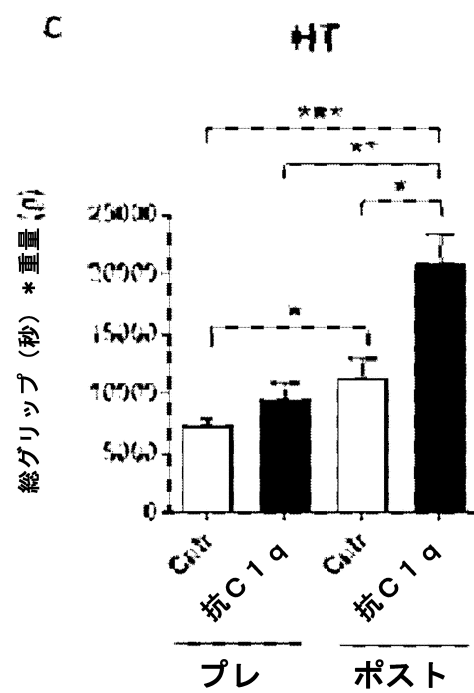
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 10 C】



10

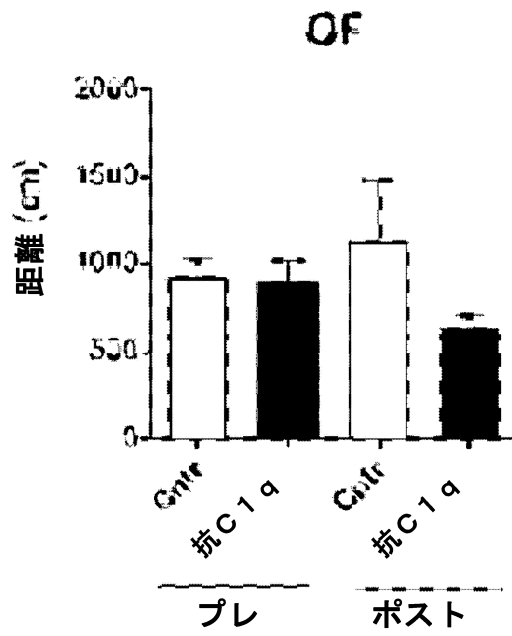
20

30

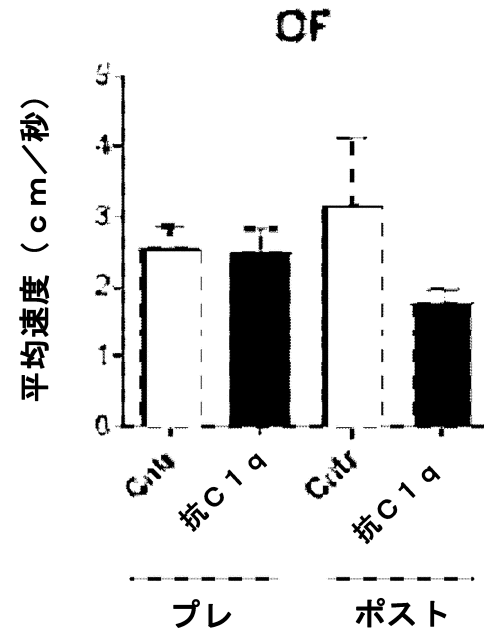
40

50

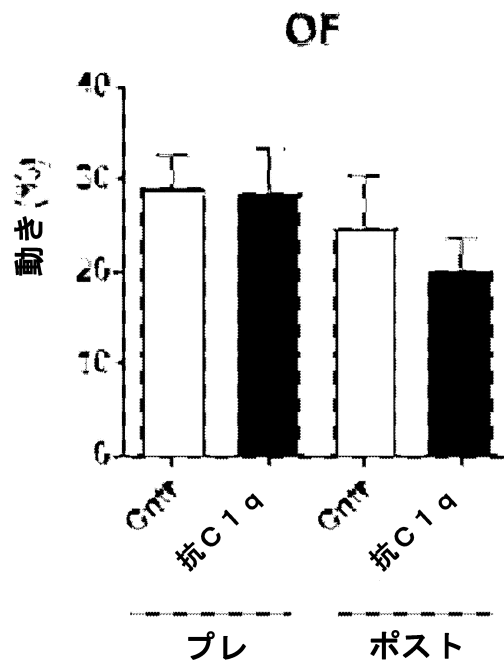
【図 10 D】



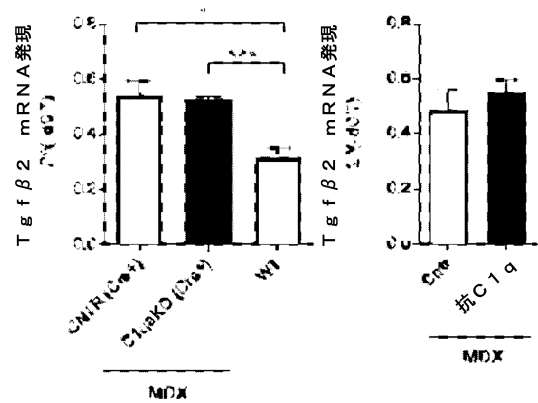
【図 10 E】



【図 10 F】



【図 11 A】



10

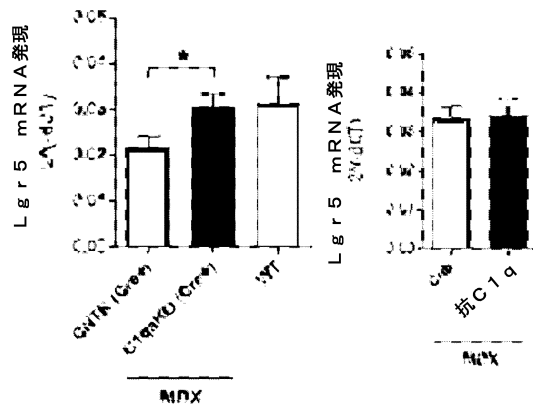
20

30

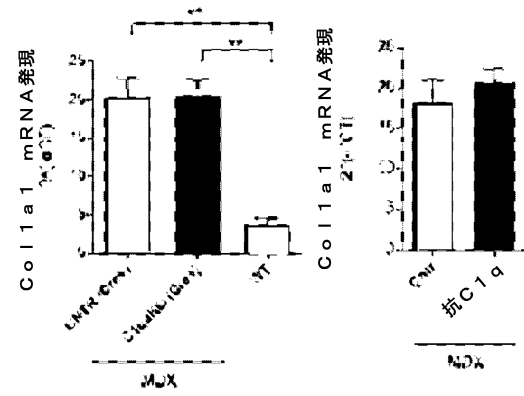
40

50

【図 1 1 B】

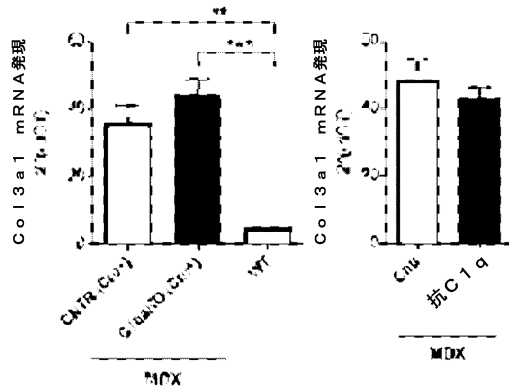


【図 1 1 C】

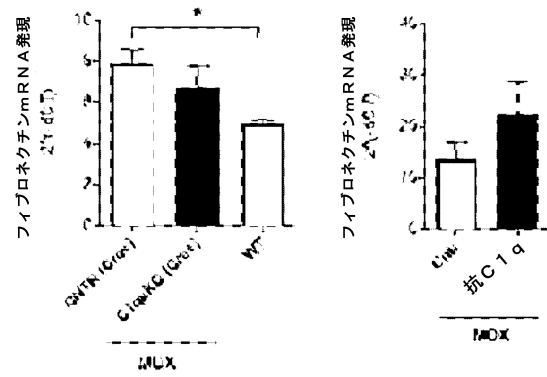


10

【図 1 1 D】



【図 1 1 E】



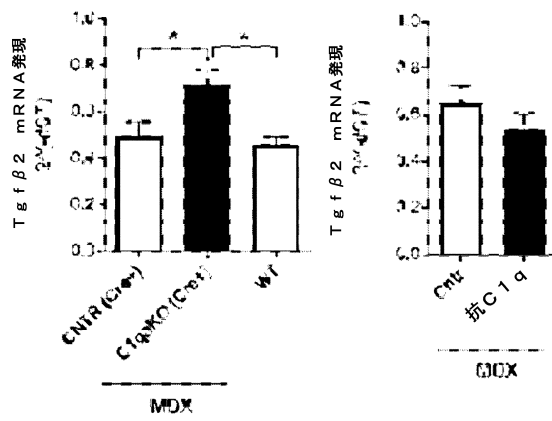
20

30

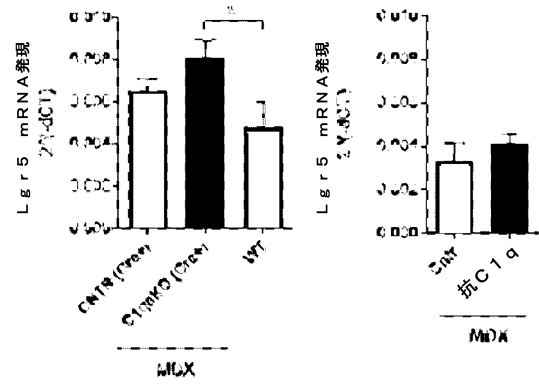
40

50

【図 1 2 A】

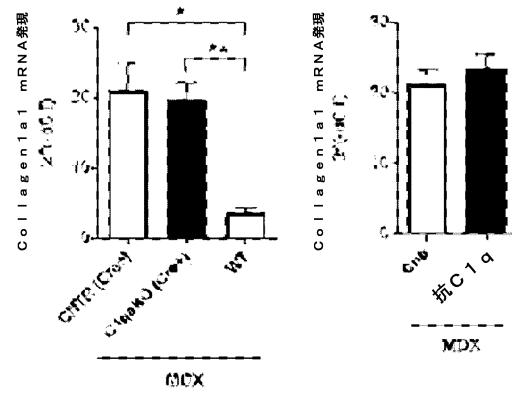


【図 1 2 B】

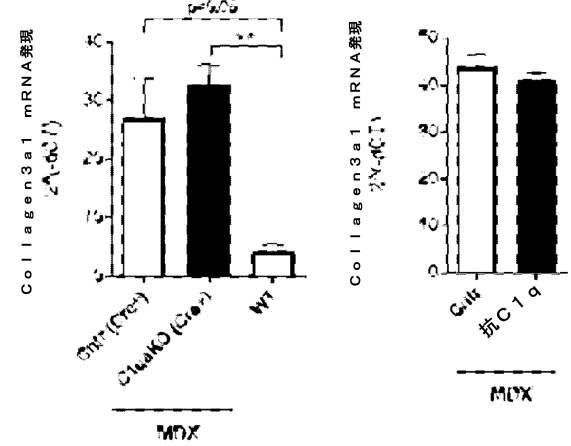


10

【図 1 2 C】



【図 1 2 D】



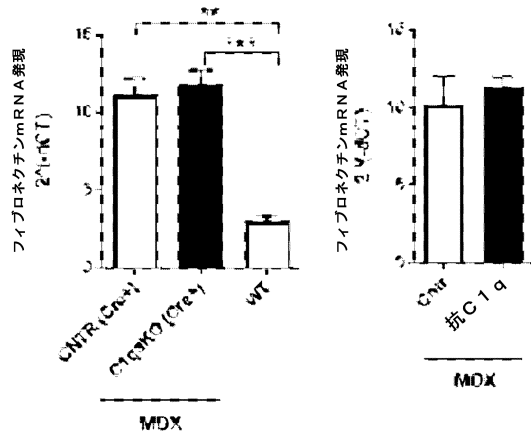
20

30

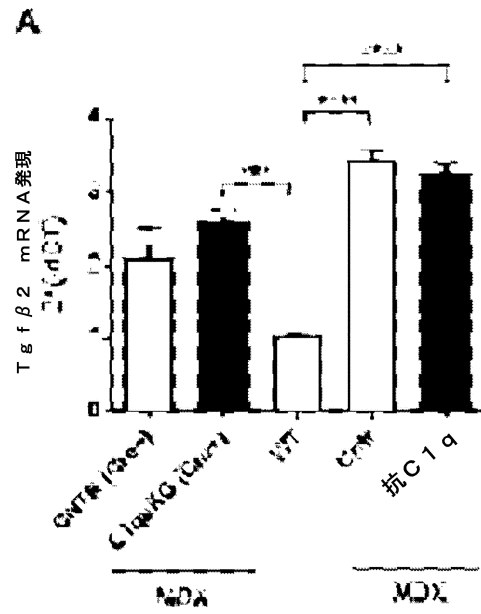
40

50

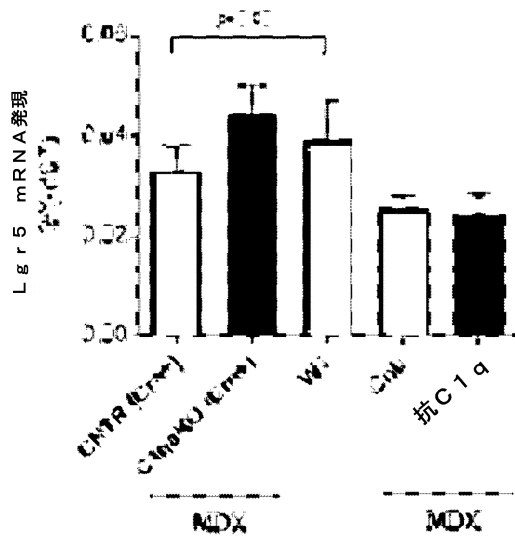
【図 1 2 E】



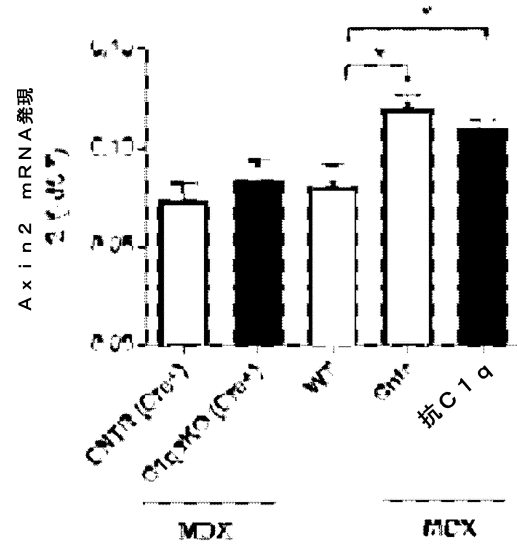
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



10

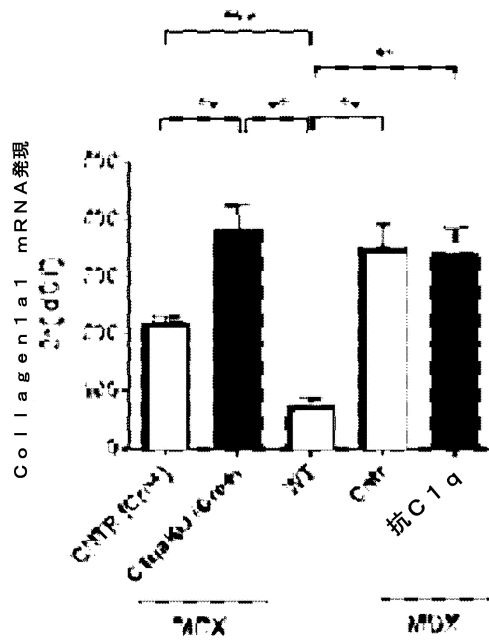
20

30

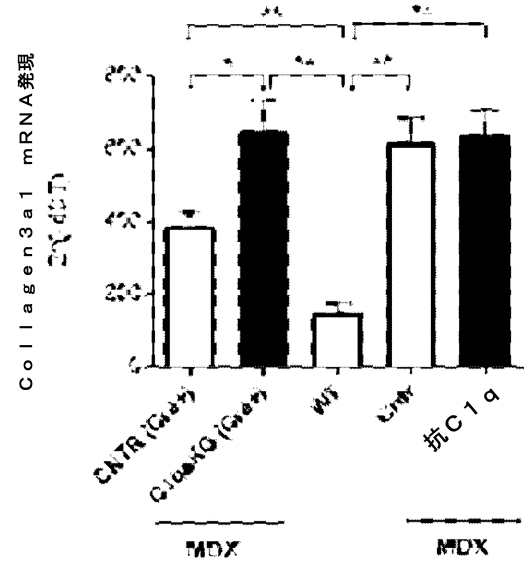
40

50

【図 1 3 D】



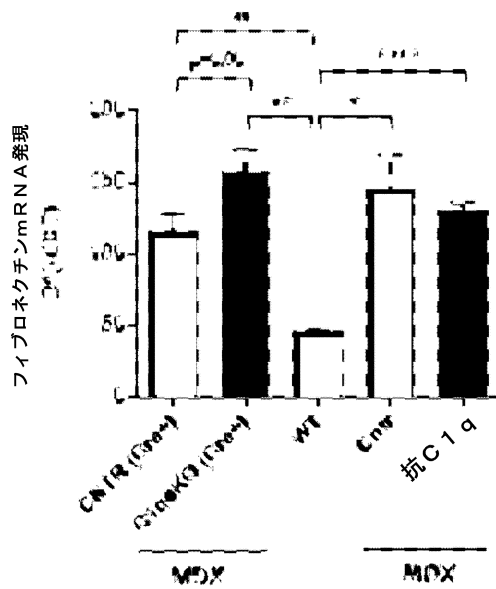
【図 1 3 E】



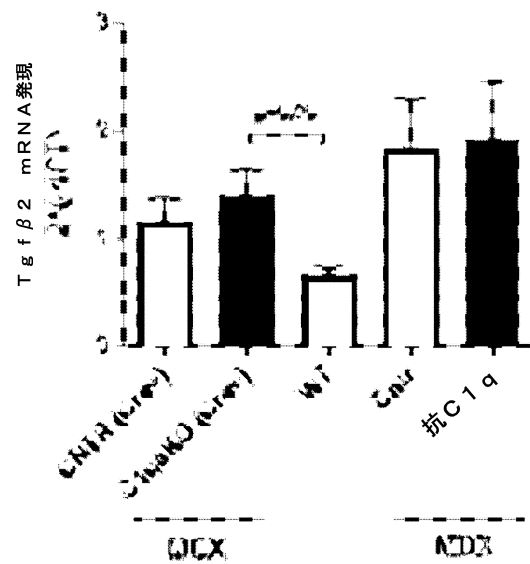
10

20

【図 1 3 F】



【図 1 4 A】

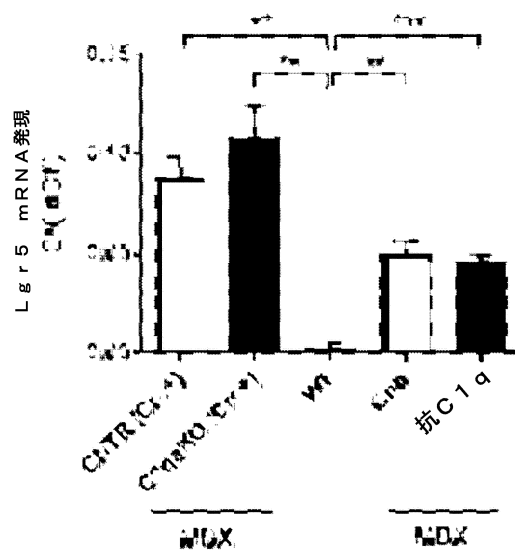


30

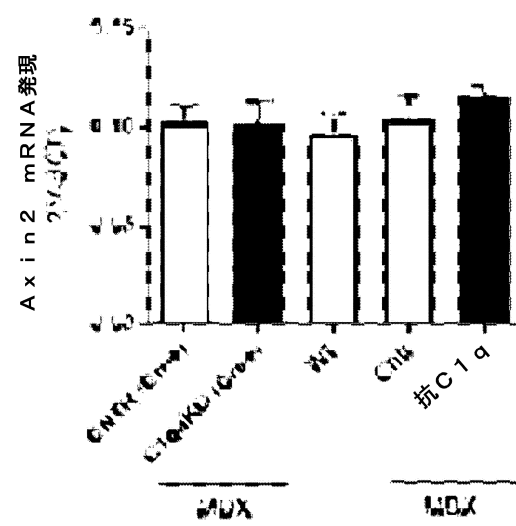
40

50

【図 1 4 B】

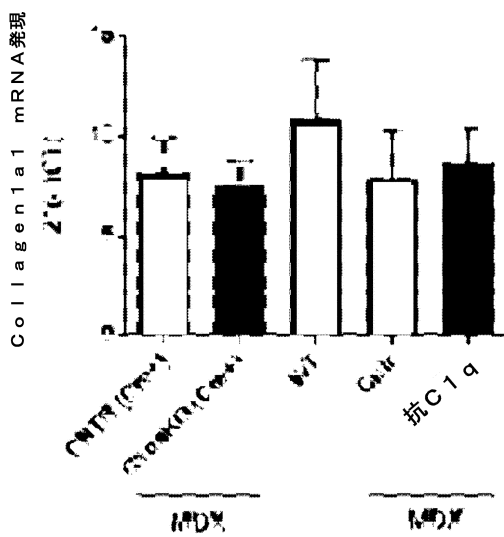


【図 1 4 C】

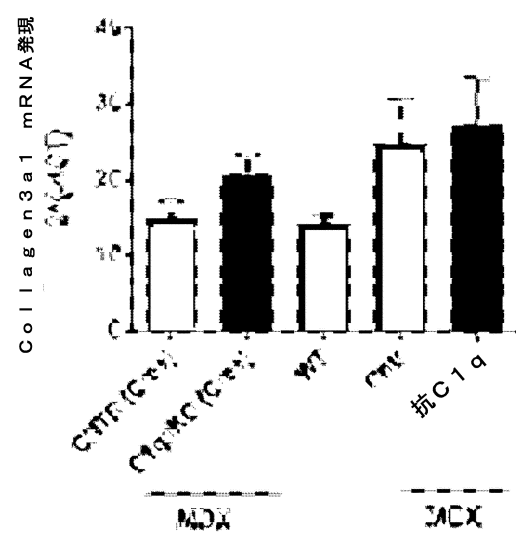


10

【図 1 4 D】



【図 1 4 E】



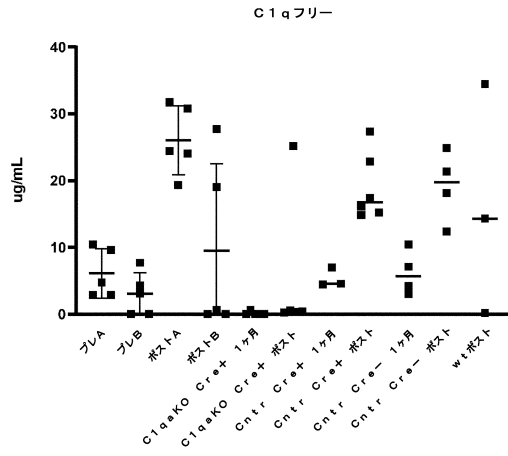
20

30

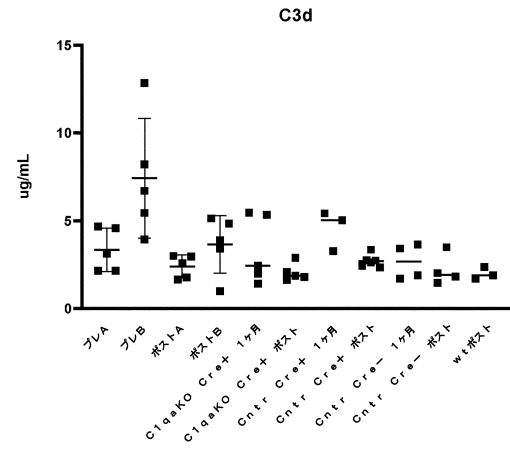
40

50

【図 16 B】

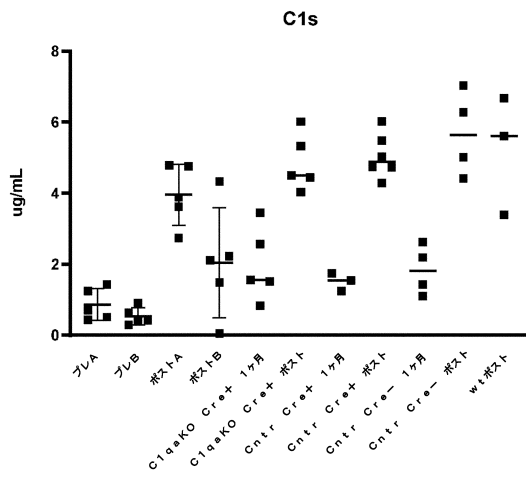


【図 16 C】

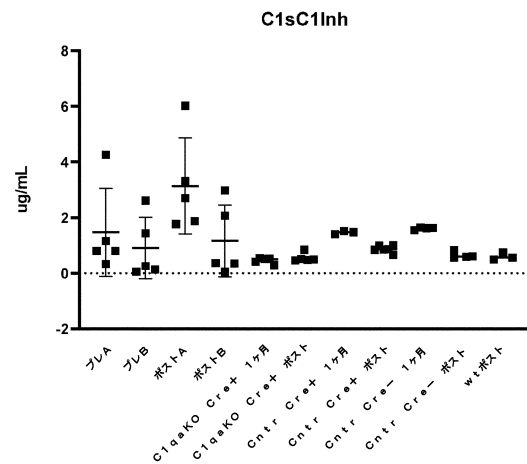


10

【図 16 D】



【図 16 E】



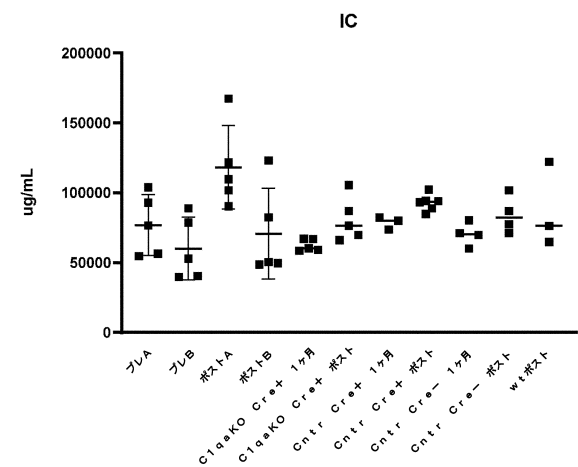
20

30

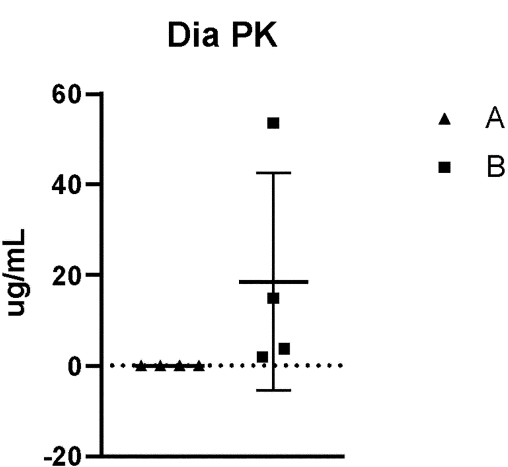
40

50

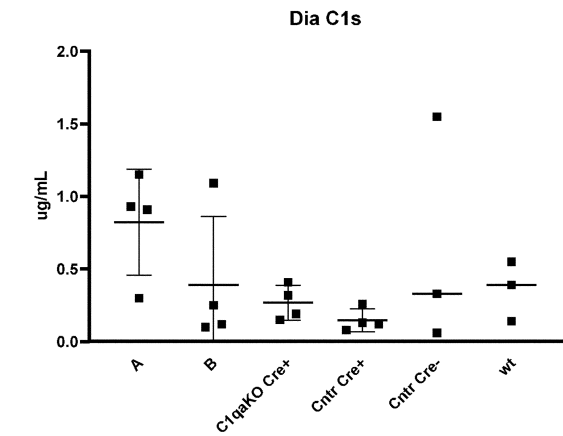
【図 1 6 F】



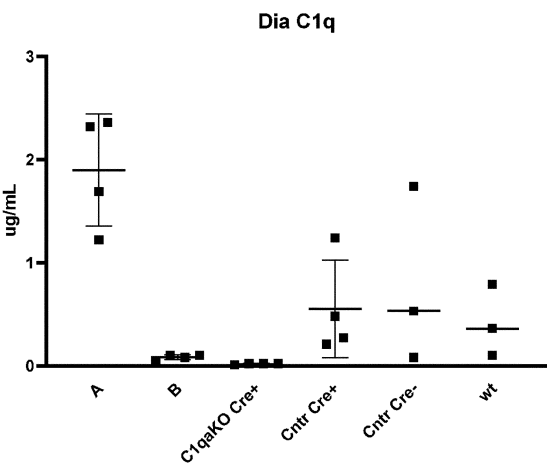
【図 1 7 A】



【図 1 7 B】



【図 1 7 C】



10

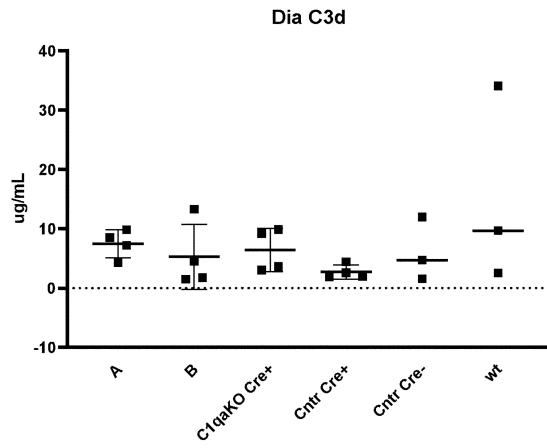
20

30

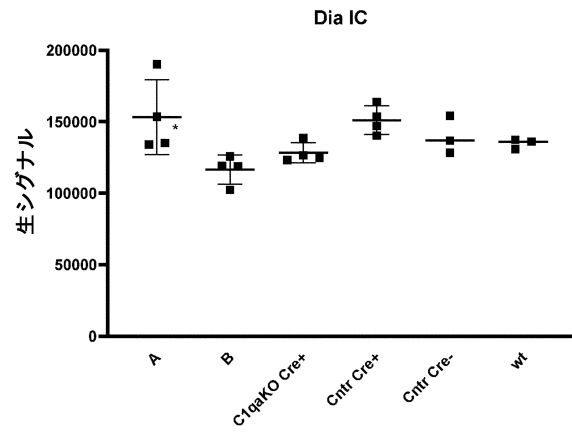
40

50

【図 17 D】

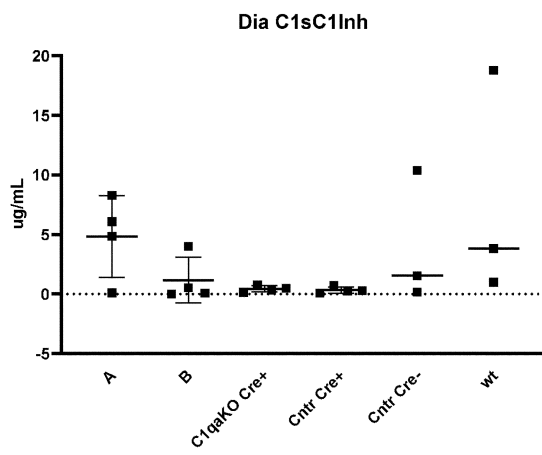


【図 17 E】

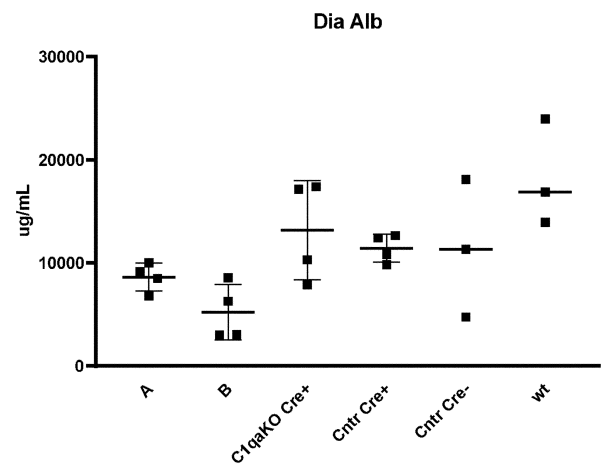


10

【図 17 F】



【図 17 G】



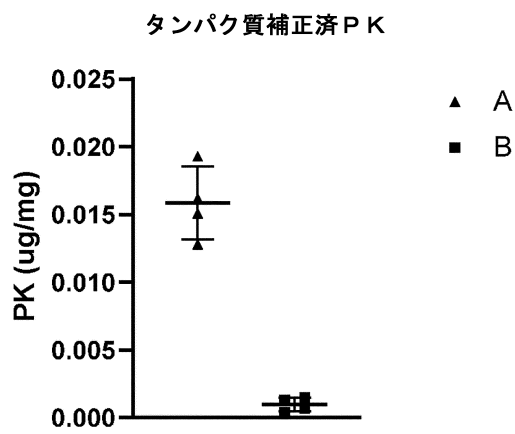
20

30

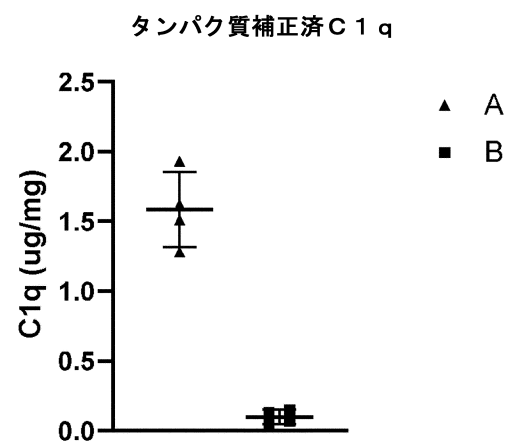
40

50

【図 1 8 A】

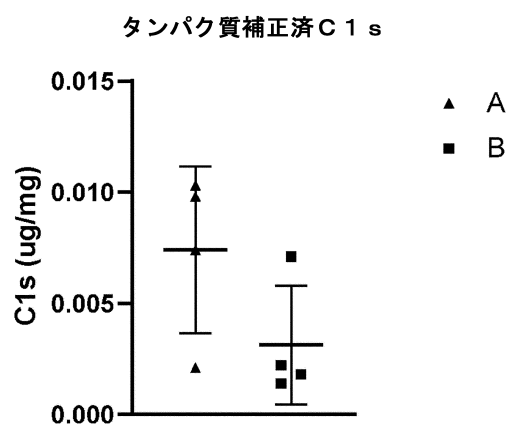


【図 1 8 B】

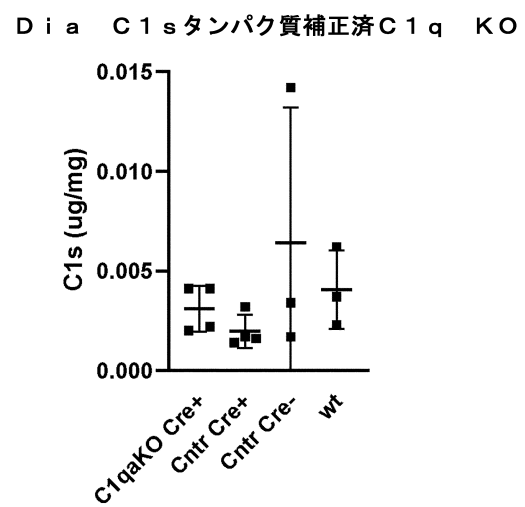


10

【図 1 8 C】



【図 1 8 D】



20

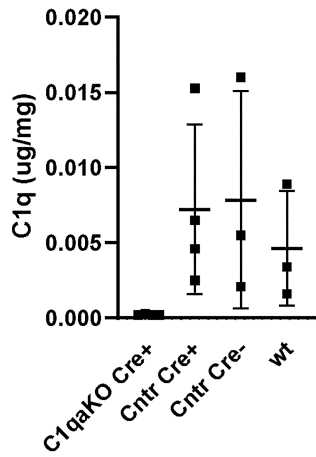
30

40

50

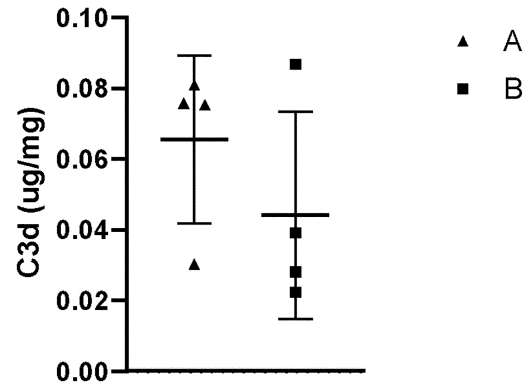
【図 1 8 E】

D i a C 1 q タンパク質補正済 C 1 q K O



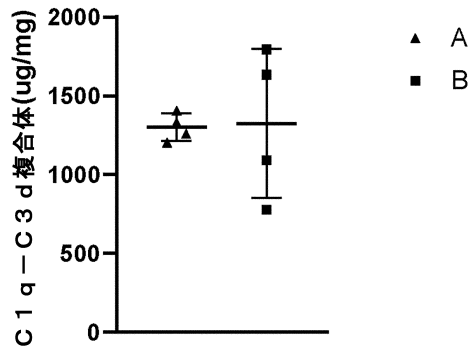
【図 1 8 F】

タンパク質補正済 C 3 d



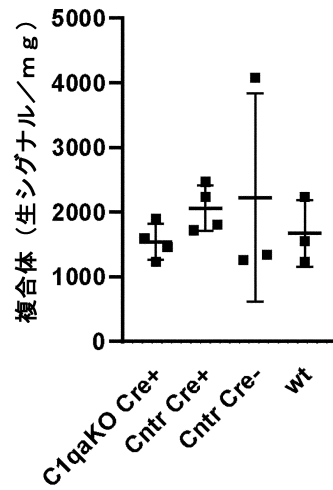
【図 1 8 G】

D I A I C 総タンパク質補正済



【図 1 8 H】

D I A I C タンパク質補正済 C 1 q K O



10

20

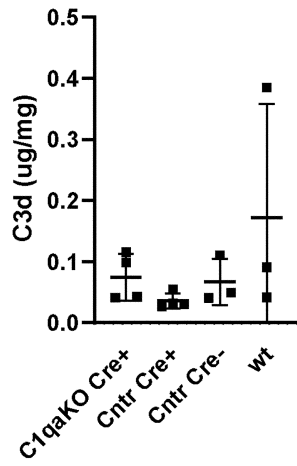
30

40

50

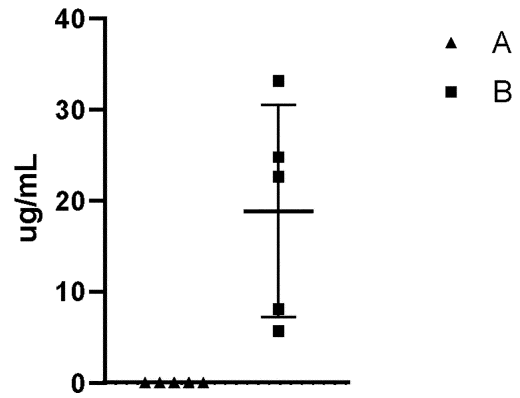
【図 18 I】

D I A C 3 d タンパク質補正済 C 1 q K O



【図 19 A】

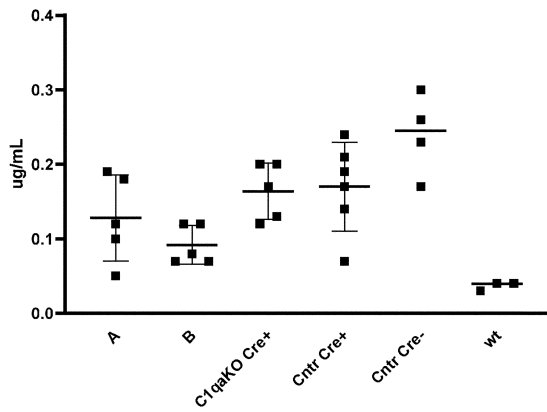
Gas PK



10

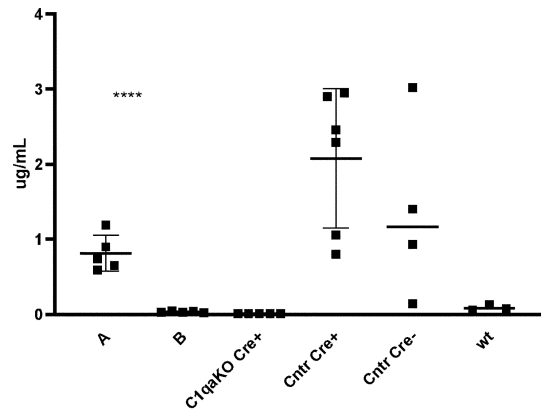
【図 19 B】

Gas C1s



【図 19 C】

Gas C1q



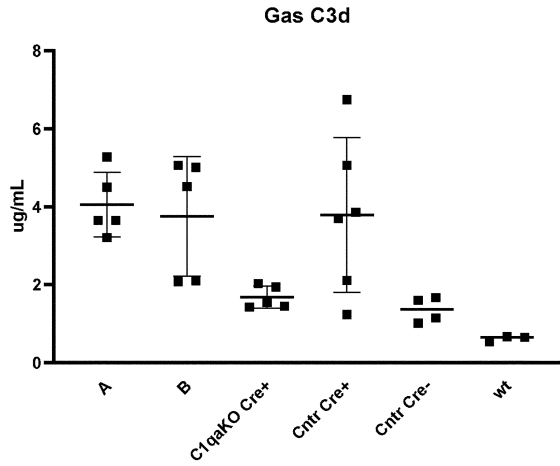
20

30

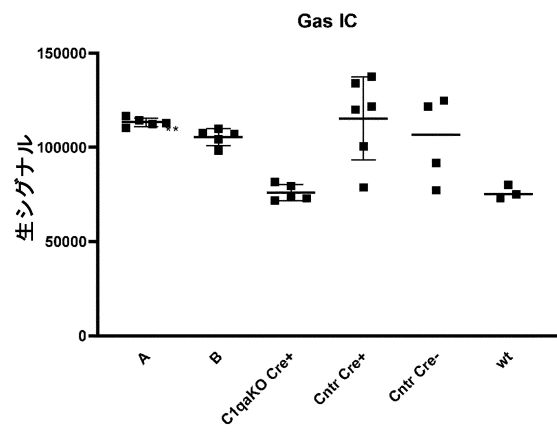
40

50

【図 19 D】

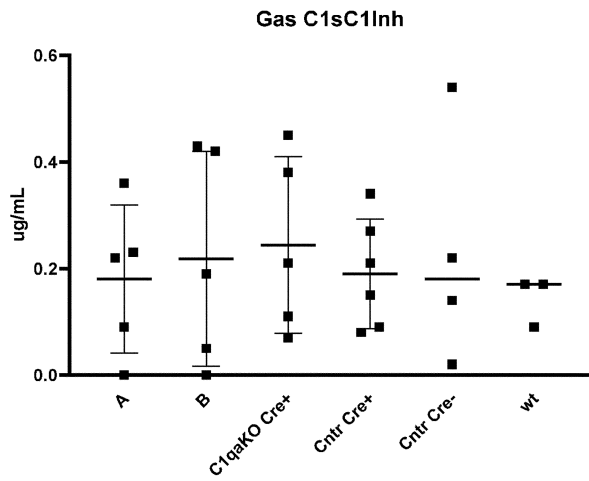


【図 19 E】

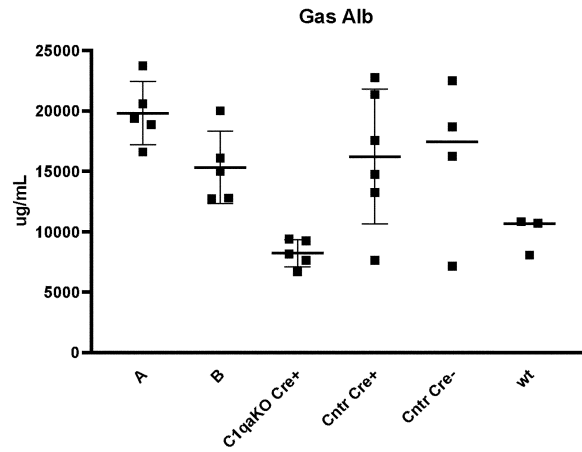


10

【図 19 F】



【図 19 G】



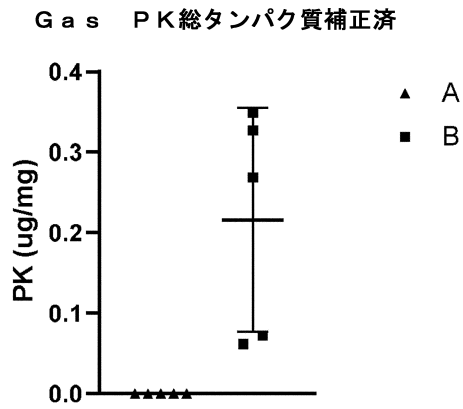
20

30

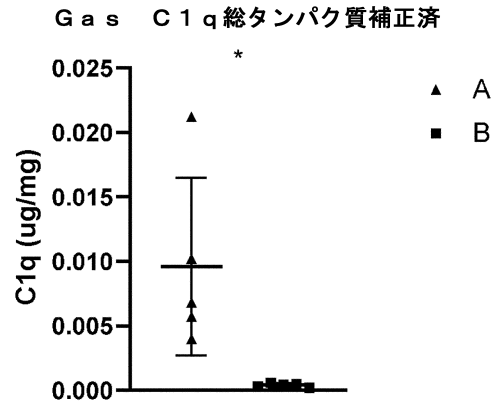
40

50

【図 2 0 A】

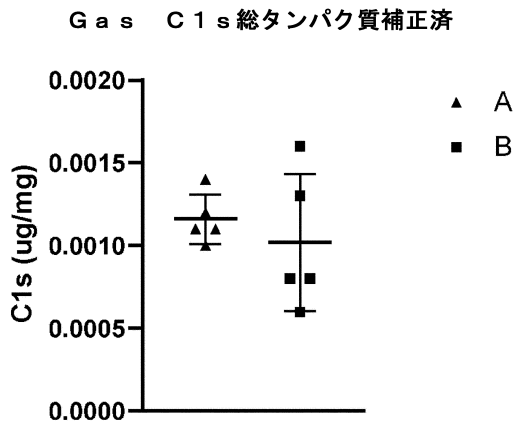


【図 2 0 B】

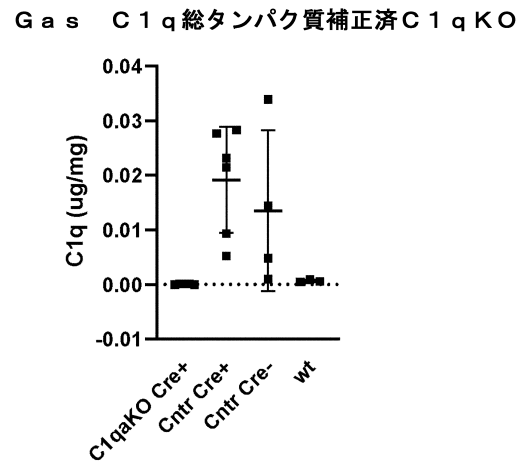


10

【図 2 0 C】



【図 2 0 D】



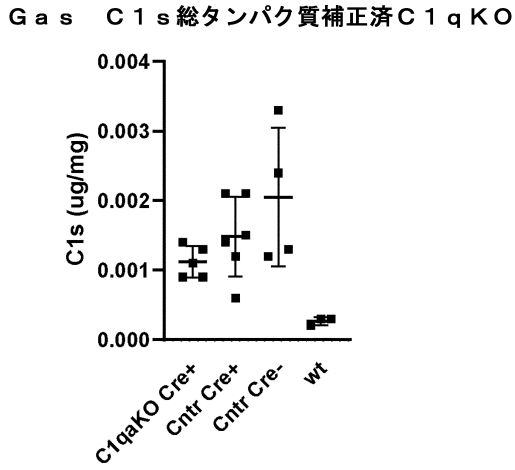
20

30

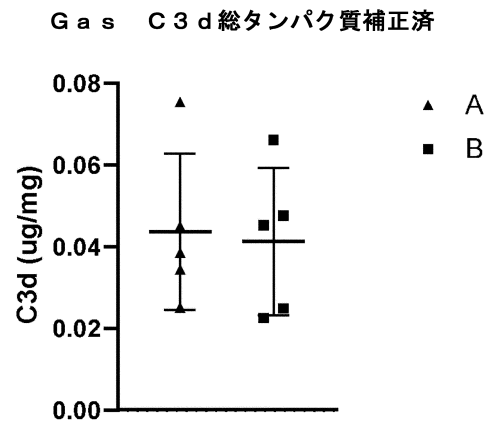
40

50

【図 20 E】

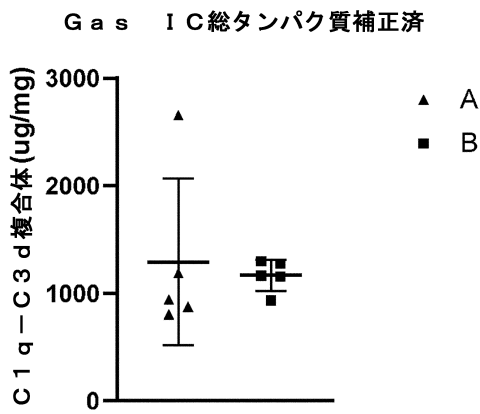


【図 20 F】

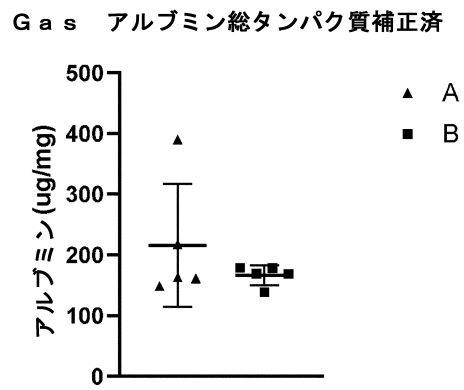


10

【図 20 G】



【図 20 H】



20

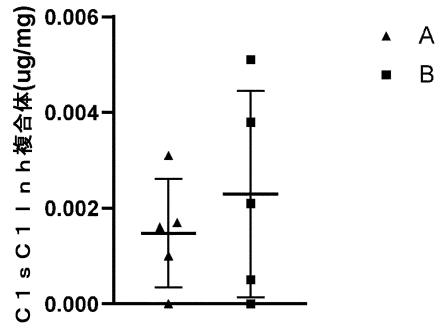
30

40

50

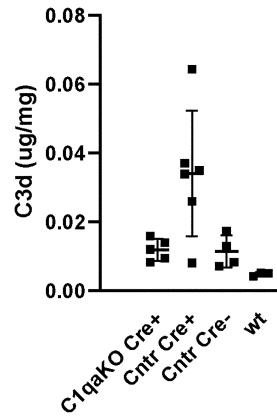
【図 20 I】

タンパク質補正済 C1s C1INH 複合体



【図 20 J】

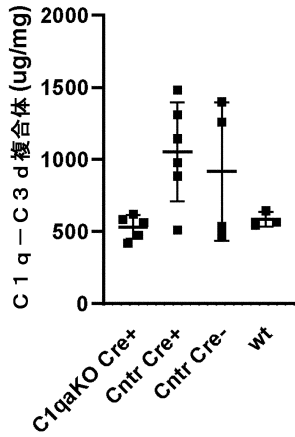
Gas C3d 総タンパク質補正済 C1q KO



10

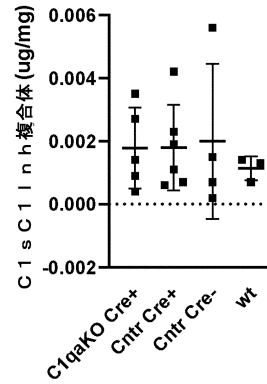
【図 20 K】

Gas IC 総タンパク質補正済 C1q KO



【図 20 L】

Gas C1s C1INH 総タンパク質補正済 C1q KO



20

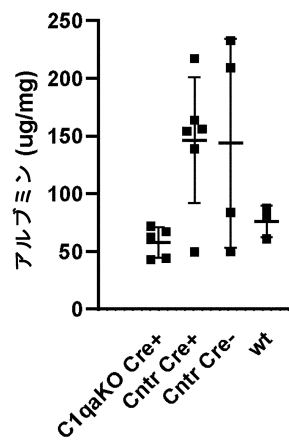
30

40

50

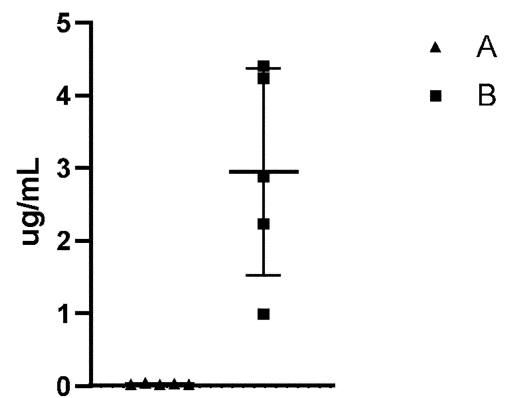
【図 2 0 M】

G a s アルブミンタンパク質補正済 C 1 q K O



【図 2 1 A】

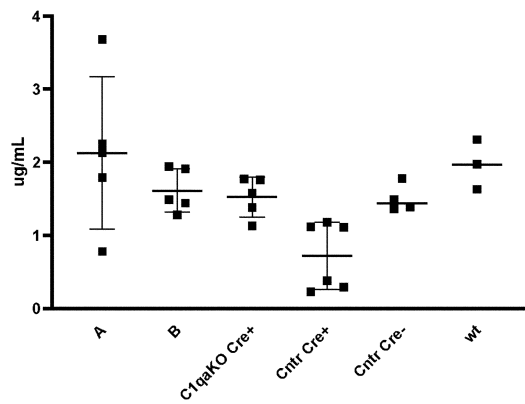
肝臓 P K



10

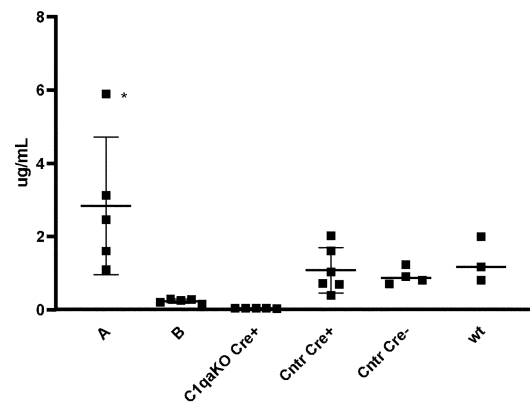
【図 2 1 B】

肝臓 C 1 s



【図 2 1 C】

肝臓 C 1 q



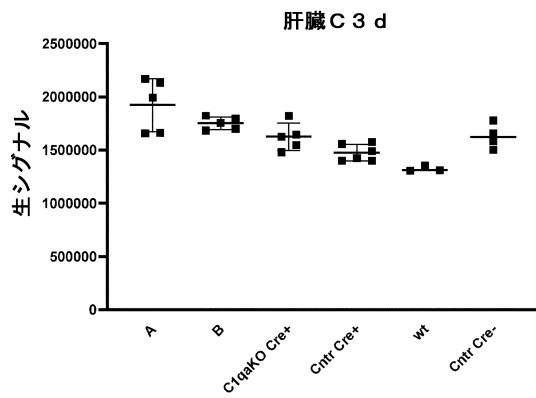
20

30

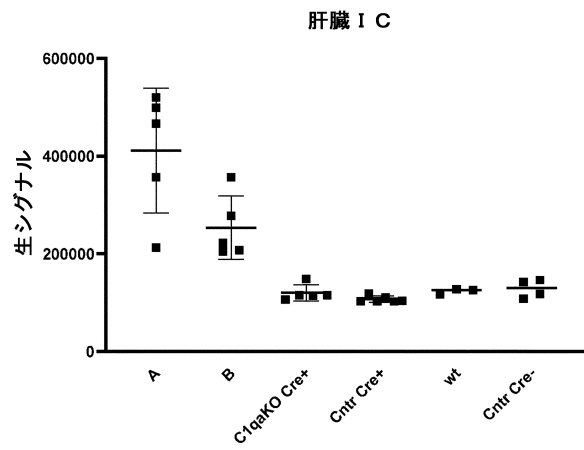
40

50

【図 2 1 D】

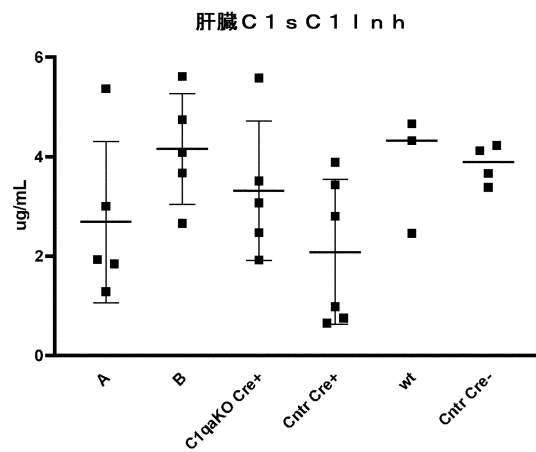


【図 2 1 E】

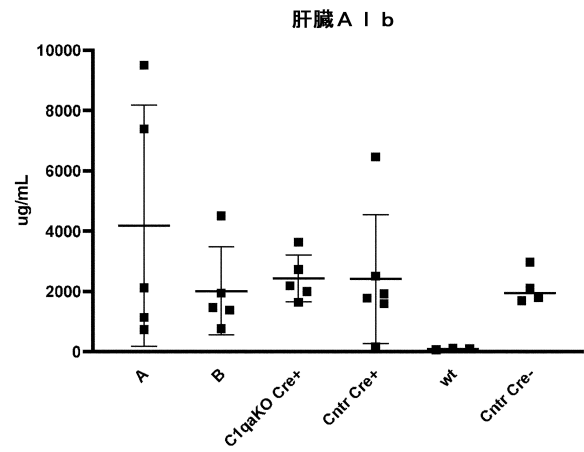


10

【図 2 1 F】



【図 2 1 G】



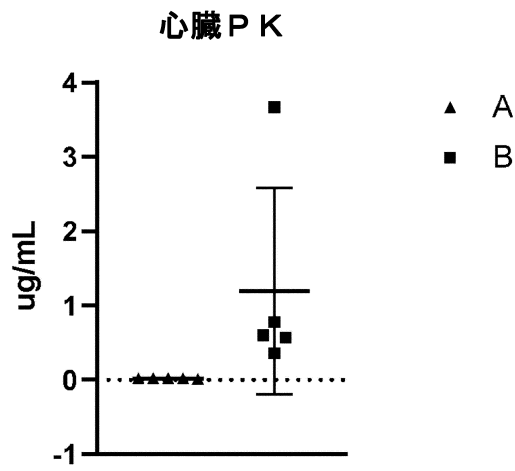
20

30

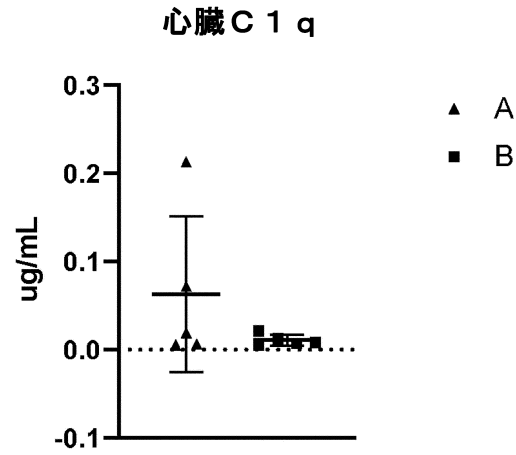
40

50

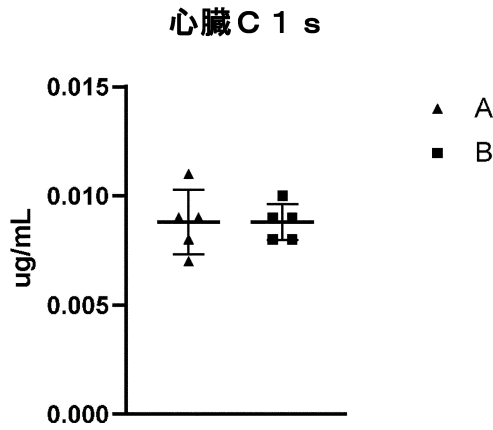
【 図 2 2 A 】



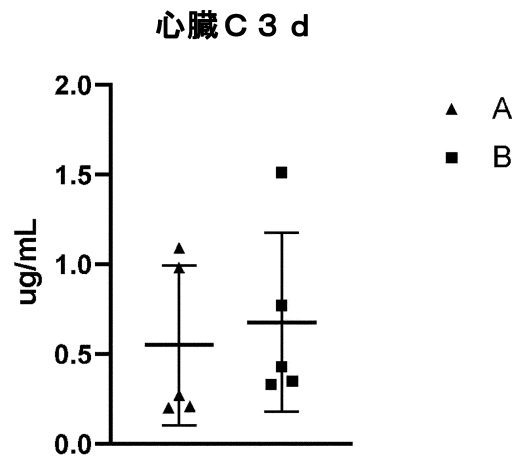
【 図 2 2 B 】



【 図 2 2 C 】



【 図 2 2 D 】



10

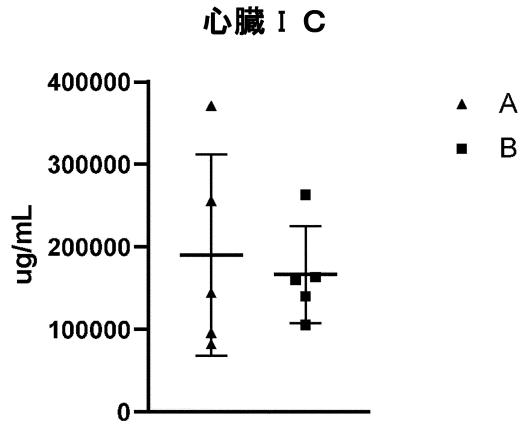
20

30

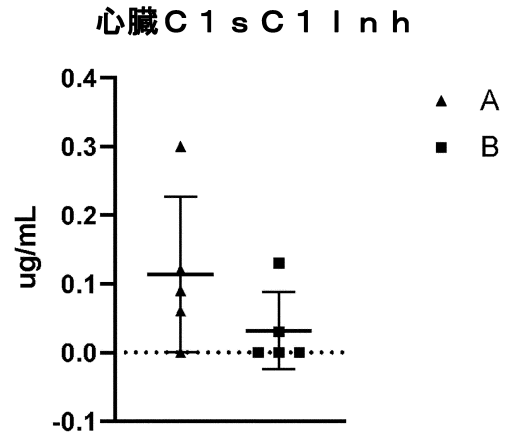
40

50

【図 2 2 E】

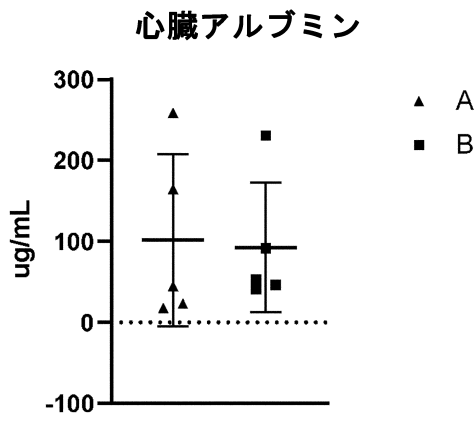


【図 2 2 F】

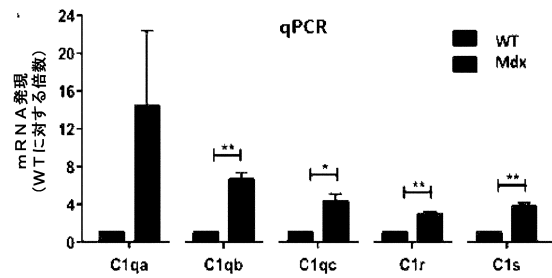


10

【図 2 2 G】



【図 2 3】



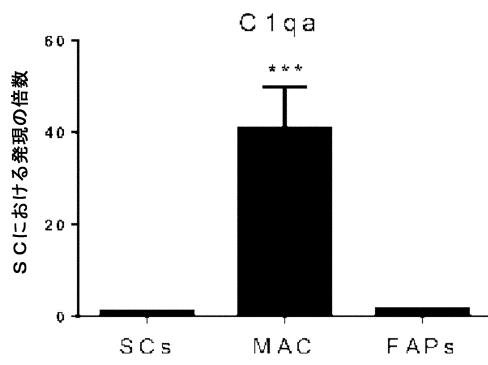
20

30

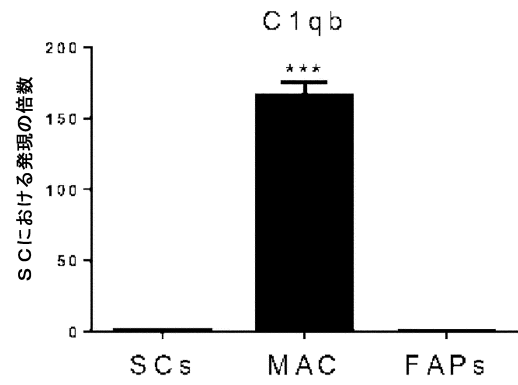
40

50

【図 2 4 A】

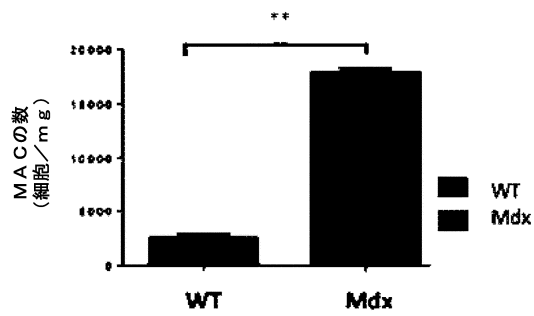


【図 2 4 B】

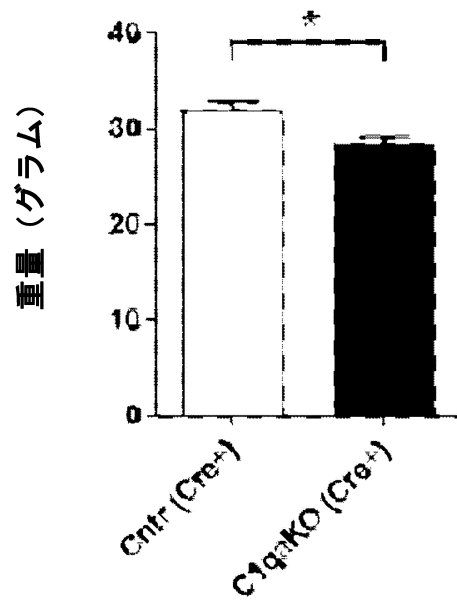


10

【図 2 4 C】



【図 2 5 A】



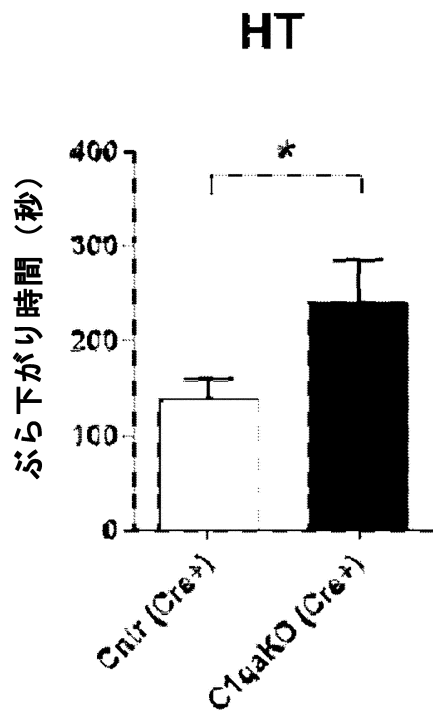
20

30

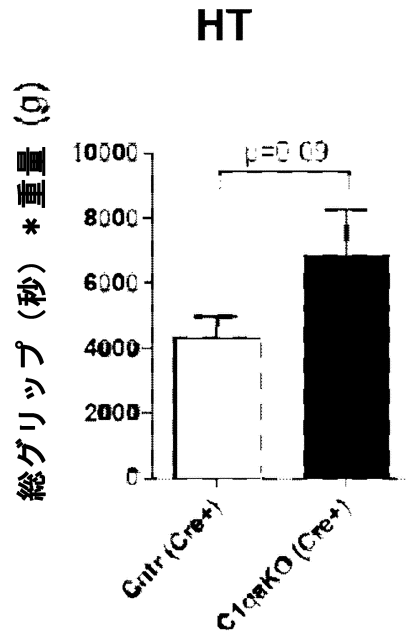
40

50

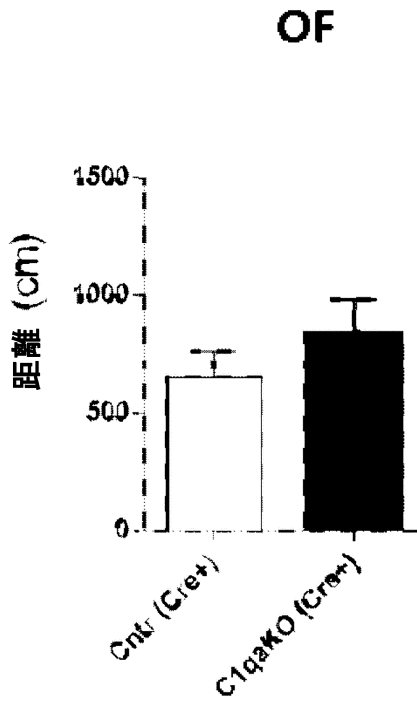
【図 2 5 B】



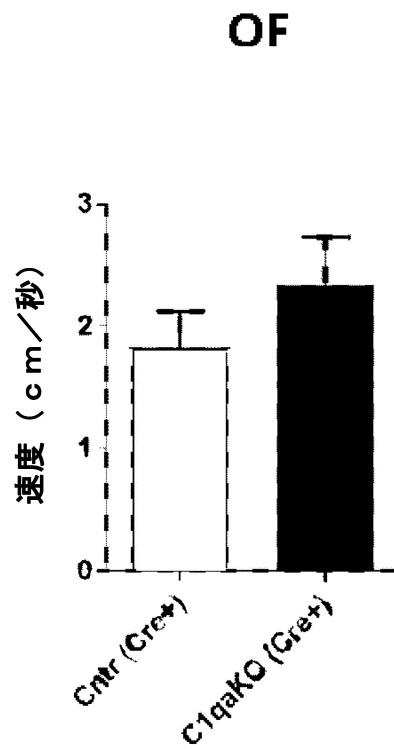
【図 2 5 C】



【図 2 5 D】



【図 2 5 E】



10

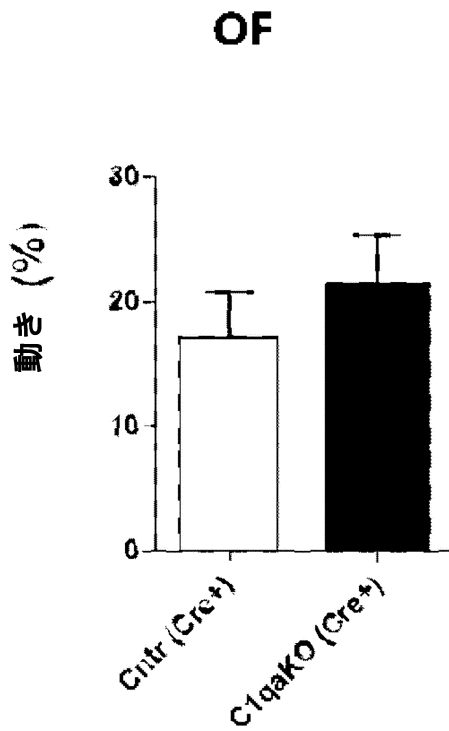
20

30

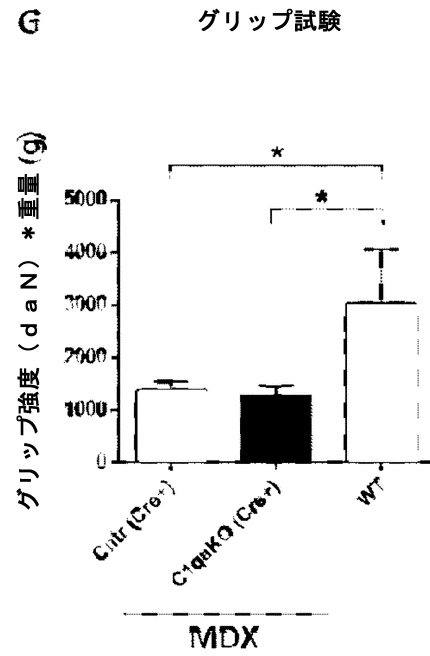
40

50

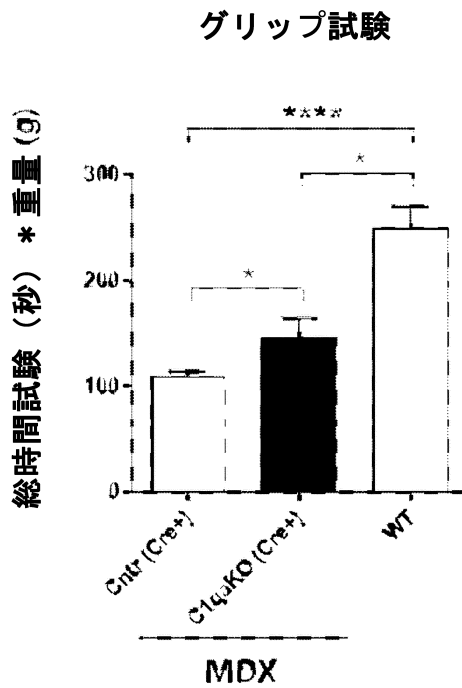
【図 2 5 F】



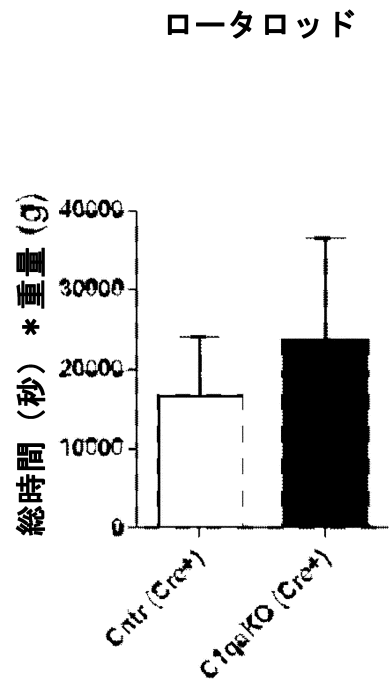
【図 2 5 G】



【図 2 5 H】



【図 2 5 I】



10

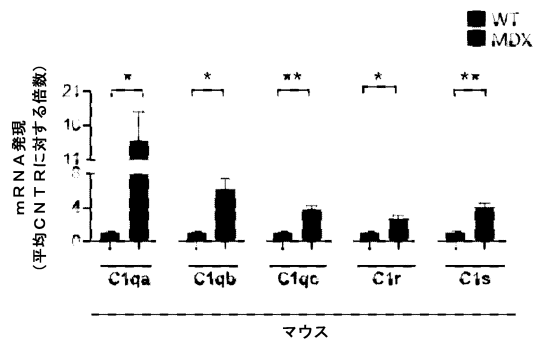
20

30

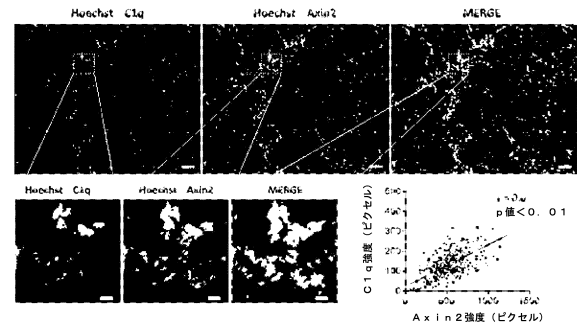
40

50

【図 26】



【図 27】



10

【配列表】

2024539141000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/078510
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395 (2023.01)i; A61P 21/00 (2023.01)i CPC:A61K 39/395; A61P 21/00 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) A61K 39/395; A61P 21/00 CPC: A61K 39/395; A61P 21/00 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) Databases consulted: CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Google Scholar, Derwent Innovation Search terms used: classical complement pathway, C1q, C1r, C1s, C1 complex, Muscular dystrophy, Duchenne, Collagen Type VI-Related Disorder, Myopathy		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Lahoria, Rajat, Dnygu Selcen, and Andrew G. Engel. "Microvascular alterations and the role of complement in dermatomyositis." Brain 139.7 (2016): 1891-1903.# https://doi.org/10.1093/brain/aww122 (2016/05/16) abstract, figure 7	1-57
A	Gainer, T. G., et al. "Genome profiling of inflammatory markers during early maturation of dystrophic mdx: utrophin (-/-) mice." FASEB JOURNAL. Vol. 17, No. 4. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL, 2003.2003/03/31) #) abstract	1-57
A	Hyzewicz, Janek, et al. "Low-intensity training and the C5a complement antagonist NOX-D21 rescue the mdx phenotype through modulation of inflammation." The American Journal of Pathology 187.5 (2017): 1147-1161.#https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.12.019 (2017/05/31) abstract, the whole document	1-57
☒ 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 12 January 2023		Date of mailing of the international search report 18 January 2023
Name and mailing address of the ISA/IL Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Israel Telephone No. 972-73-3927172 Email: ptoffice@justice.gov.il		Authorized officer HOROWITZ Anat Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

International application No.

PCT/US2022/078510

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016368973 A1 (ANNEXON INC[US]) 22 December 2016 (2016-12-22) examples	29-35,57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/078510

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 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2022/078510

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2016368973	A1	22 December 2016	US	2016368973	A1	22 December 2016
				US	9708394	B2	18 July 2017
				AU	2014287221	A1	21 January 2016
				AU	2014287221	B2	12 September 2019
				AU	2014287221	C1	05 March 2020
				BR	112016000106	A2	12 December 2017
				CA	2916521	A1	15 January 2015
				CN	105682740	A	15 June 2016
				CN	105682740	B	11 June 2021
				EA	201690182	A1	31 October 2016
				EA	037325	B1	12 March 2021
				EP	3019240	A1	18 May 2016
				EP	3019240	A4	04 January 2017
				EP	3019523	A1	18 May 2016
				EP	3019523	A4	28 December 2016
				HK	1225678	A1	15 September 2017
				IL	243506	B	29 July 2021
				JP	2016526393	A	05 September 2016
				JP	6462680	B2	30 January 2019
				JP	2019071889	A	16 May 2019
				JP	6653009	B2	26 February 2020
				KR	20160058752	A	25 May 2016
				KR	102321320	B1	03 November 2021
				MX	2015017341	A	06 July 2016
				NZ	715455	A	24 December 2021
				SG	10201710758P	A	27 February 2018
				SG	10202008809R	A	29 October 2020
				SG	11201510316U	A	28 January 2016
				US	2017334976	A1	23 November 2017
				US	10227398	B2	12 March 2019
				US	2019211084	A1	11 July 2019
				US	10590190	B2	17 March 2020
				US	2020239557	A1	30 July 2020
				US	10927167	B2	23 February 2021
				US	2016159890	A1	09 June 2016
				US	2021277096	A1	09 September 2021
				WO	2015006504	A1	15 January 2015
				WO	2015006507	A1	15 January 2015

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	A 6 1 K 31/7105	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z Z N A
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
	C 1 2 N 15/13	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),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,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,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ヴァレーゼ 1 6 / ビ

- (74)代理人 110002572
弁理士法人平木国際特許事務所
- (72)発明者 ビレッシ, ステファノ
イタリア国 3 8 1 2 3 ポヴォ, ソンマリヴェ 9
- (72)発明者 フローリオ, フランチェスカ
イタリア国 3 8 1 2 3 ポヴォ, ソンマリヴェ 9
- (72)発明者 アンドリューズ-ツヴィリング, ヤイサ
アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州, ブリスベン, セカンド フロア, ビルディング
シー, シエラ ポイント パークウェイ 1 4 0 0, アネクソン, インコーポレーテッド
- F ターム (参考) 4C084 AA13 AA17 NA14 ZA94
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB41 BB43
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA94
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74