



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2710114 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 1/19 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.01.24
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.11.03
(86)	European Application Nr.	12789187.7
(86)	European Filing Date	2012.05.08
(87)	The European Application's Publication Date	2014.03.26
(30)	Priority	2011.05.20, US, 201161488660 P 2011.06.14, US, 201161496860 P 2011.06.14, US, 201161496873 P 2011.08.19, US, 201161525307 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	H. Lundbeck A/S, Ottiliavej 9, 2500 Valby, Danmark
(72)	Inventor	MCNEILL, Patricia, Dianne, Federal Way, WA 98003, USA JANSON, Nicole, Edmonds, WA 98026, USA LESNICKI, Gary, L., Woodinville, WA 98072, USA QI, Pei, Bothell, WA 98021, USA LATHAM, John, A., Seattle, WA 98119, USA GARCIA-MARTINEZ, Leon, F., Woodinville, WA 98072, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	HIGH-PURITY PRODUCTION OF MULTI-SUBUNIT PROTEINS SUCH AS ANTIBODIES IN TRANSFORMED MICROBES SUCH AS PICHIA PASTORIS
------	-------	--

(56)	References Cited:	WO-A2-02/48382 WO-A2-2012/075340 US-A1- 2004 077 069 WO-A2-2008/063302 WO-A2-00/56903 US-B2- 7 927 863 MICHELE SALIOLA ET AL.: "Use of the KIADH4 promoter for ethanol-dependent production of
------	----------------------	--

recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. vol. 65, no. 1, January 1999, pages 53 - 60, XP002172958

KRISTIN BAUMANN ET AL: "Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 100, no. 1, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 177-183, XP55026399, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.21763

TEUN VAN DE LAAR ET AL: "Increased Heterologous Protein Production by *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Ethanol as Sole Carbon Source", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 96, no. 3, 15 February 2007 (2007-02-15), pages 483-494, XP007914112, ISSN: 0006-3592 [retrieved on 2006-08-31]

STEPHAN HELLWIG ET AL.: 'Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations' BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. vol. 74, no. 4, 20 August 2001, pages 344 - 352, XP055134090

None

E Thalia David ET AL: "E THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Studies on the Effect of Ethanol on Eukaryotic Protein Synthesis in Vitro**", J. Biol. Chem. at EUROPEAN PATENT OFFICE on October, 25 June 1983 (1983-06-25), pages 7702-7706, XP055144164, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.jbc.org/content/258/12/7702.full.pdf> [retrieved on 2014-10-02]

MUHLBAUER E ET AL: "Impaired immunoglobulin M production by incubation of hybridoma cells with ethanol", ALCOHOL, PERGAMON PRESS, LONDON, GB, vol. 24, no. 3, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 179-187, XP027230584, ISSN: 0741-8329 [retrieved on 2001-07-01]

TAPANI E ET AL: "Toxicity of ethanol in low concentrations. Experimental evaluation in cell culture.", ACTA RADIOLOGICA (STOCKHOLM, SWEDEN : 1987) NOV 1996, vol. 37, no. 6, November 1996 (1996-11), pages 923-926, XP009180529, ISSN: 0284-1851

TEUN VAN DE LAAR ET AL.: 'Increased heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol as sole carbon source' BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. vol. 96, no. 3, 15 February 2007, pages 483 - 494, XP007914112

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å produsere et multi-underenhetskompleks, omfattende:

- 5 (a) tilveiebringe et dyrkningsmedium som omfatter *Pichia pastoris* celler som omfatter gener som sørger for ekspresjonen av underenhetene til nevnte multi-underenhetskompleks;
- (b) tilsetning av en bolusdose etanol til dyrkningsmediet, som resulterer i en etanolkonsentrasjon i dyrkningsmediet på mellom 0,5 % og 1,5 %
- 10 (vekt/volum); og
- (c) tilsette et fôr som omfatter minst én fermenterbar karbonkilde til nevnte dyrkningsmedium, og dyrke i nevnte dyrkningsmedium for å produsere nevnte multi-underenhetskompleks,
- hvor multi-underenhetskomplekset omfatter et hel- eller full-lengde
- 15 antistoff som omfatter tung- og lett kjedepolypeptider,
- hvor multi-underenhetskomplekset ikke er et anti-NGF-antistoff som inneholder polypeptidsekvensene SEKV ID NR: 401 og SEKV ID NR: 402.

20 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor:

- (i) bolusdosen etanol øker dannelsen av stabile disulfidbindinger i forhold til den samme metoden utført i fravær av bolusdosen etanol;
- (ii) dyrkingsmetoden reduserer den relative mengden av én eller flere produktassosierte varianter i forhold til den samme metoden utført i
- 25 fravær av bolusdosen etanol;
- (iii) dyrkingsmetoden reduserer den relative mengden av produktassosierte varianter som har en høyere eller lavere tilsynelatende molekylvekt enn det ønskede antistoffet som påvist ved størrelseseksklusjonskromatografi eller gelelektroforese i forhold til den
- 30 samme metoden utført i fravær av bolusdosen etanol;

- (iv) dyrkingsmetoden reduserer den relative mengden av antistoffer med avvikende støkiometri i forhold til den samme metoden utført i fravær av bolusdosen etanol;
- (v) dyrkingsmetoden reduserer den relative mengden av antistoffer med avvikende disulfidbindinger i forhold til den samme metoden utført i fravær av bolusdosen etanol;
- (vi) dyrkingsmetoden reduserer den relative mengden av antistoffer som har reduserte cysteiner i forhold til den samme metoden utført i fravær av bolusdosen etanol;
- (vii) dyrkingsmetoden reduserer den relative mengden av antistoffer med avvikende glykosylering i forhold til den samme metoden utført i fravær av bolusdosen etanol;
- (viii) dyrkingsmetoden modulerer dannelsen eller stabiliteten av disulfidbindinger mellom tunge kjeder;
- (ix) dyrkingsmetoden modulerer dannelsen eller stabiliteten av disulfidbindinger som forbinder de lette og tunge kjedene til antistoffet;
- (x) dyrkingsmetoden reduserer det relative overskuddet av én eller flere av H1L1-, H2L1- og H4L4-produkttilknyttede varianter; eller
- (xi) dyrkingsmetoden øker renheten til nevnte antistoff i forhold til nevnte metode utført i fravær av nevnte bolusdose etanol.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvor:

- (i) trinn (b) resulterer i en konsentrasjon av etanol i dyrkningsmediet på mellom 0,7 % og 1,5 %, eller mellom 0,8 % og 1,25 % (vekt/volum);
- (ii) trinn (b) resulterer i en konsentrasjon av etanol i dyrkningsmediet på 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 % eller 0,9 % (vekt/volum);
- (iii) trinn (b) resulterer i en konsentrasjon av etanol i nevnte dyrkningsmedium på 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1,0 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 % eller 0,5 % (vekt/volum);
- (iv) trinn (b) omfatter tilsetning av etanol til dyrkningsmediet, tilsetning av en bærer omfattende etanol til dyrkningsmediet, tilsetning av cellene

til et medium eller bærer omfattende etanol, eller erstatning av deler av dyrkningsmediet;

(v) bolusdosen etanol tilsettes dyrkningsmediet over et tidsrom på mellom 1 og 20 minutter;

5 (vi) trinn (c) omfatter å tilveiebringe oksygen til nevnte celler;

(vii) trinn (c) omfatter å tilføre oksygen til nevnte celler ved å agitere dyrkningsmediet;

(viii) trinn (c) omfatter å tilveiebringe oksygen til cellene ved å bringe dyrkningsmediet i kontakt med en gassblanding omfattende oksygen;

10 (ix) trinn (c) omfatter tilsetning av et fôr som omfatter ett eller flere av glukose, etanol, sitrat, sorbitol, xylose, trehalose, arabinose, galaktose, fruktose, melibiose, laktose, maltose, rhamnose, ribose, mannose, mannitol og raffinose;

(x) dyrkingsmetoden omfatter videre å opprettholde konsentrasjonen av etanol mellom et øvre settpunkt og et nedre settpunkt under trinn
15 (c);

(xi) dyrkingsmetoden omfatter videre å opprettholde konsentrasjonen av etanol mellom et øvre settpunkt og et nedre settpunkt under trinn
(c), hvor det nedre settpunktet er 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 % eller 0,9
20 % (vekt/volum);

(xii) dyrkingsmetoden omfatter videre å opprettholde konsentrasjonen av etanol mellom et øvre settpunkt og et nedre settpunkt under trinn (c) hvor nevnte øvre settpunkt er 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1,0 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 % eller 0,6 % (vekt/volum); eller

25 (xiii) dyrkingsmetoden omfatter videre å opprettholde konsentrasjonen av etanol mellom et øvre settpunkt og et nedre settpunkt under trinn (c), hvor det nedre settpunktet er 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 % eller 0,9 % (vekt/volum) og nevnte øvre settpunkt er 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1,0 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 % eller 0,6 % (vekt/volum).

4. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor:

(i) konsentrasjonen av etanol holdes ved et settpunkt under trinn (c);

(ii) konsentrasjonen av etanol holdes ved et settpunkt som er 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,4 % eller 1,5 % (vekt/volum) under trinn (c);

(iii) trinn (c) omfatter å opprettholde konsentrasjonen av etanol i dyrkningsmediet på mellom 0,7 % og 1,5 %, eller mellom 0,8 % og 1,25 % (vekt/volum);

(iv) konsentrasjonen av etanol i dyrkningsmediet i trinn (c)

opprettholdes ved å kontrollere produksjonen av etanol fra nevnte celler eller ved tilsetning av etanol til nevnte dyrkningsmedium;

(v) konsentrasjonen av etanol i dyrkningsmediet i trinn (c)

opprettholdes ved å kontrollere produksjonen av etanol fra nevnte celler eller ved tilsetning av etanol til nevnte dyrkningsmedium, hvor trinnet

med å kontrollere produksjonen av etanol omfatter å kontrollere en eller flere av konsentrasjonene av glukose, tilgjengelighet av oksygen, intensitet av omrøring, gasstrykk, strømningshastighet av tilført luft eller annen gassblanding, viskositet av dyrkningsmediet, kulturtetthet, konsentrasjon av oksygen i den tilførte luften eller annen gassblanding, og temperatur;

(vi) tiden mellom trinn (a) og trinn (b) er mindre enn 72 timer, mindre enn 48 timer, mindre enn 24 timer, mindre enn 12 timer, mindre enn 9 timer, mindre enn 6 timer, mindre enn 5 timer, mindre enn 4 timer, mindre enn 3 timer, mindre enn 90 minutter, mindre enn 30 minutter, mindre enn 5 minutter eller mindre enn 1 minutt;

(vii) tiden mellom trinn (b) og trinn (c) er mindre enn 10 timer, mindre enn 9 timer, mindre enn 8 timer, mindre enn 7 timer, mindre enn 6 timer, mindre enn 5 timer, mindre enn 4 timer, mindre enn 3 timer, mindre enn 2 timer, mindre enn 90 minutter, mindre enn 80 minutter, mindre enn 70 minutter, mindre enn 60 minutter, mindre enn 50 minutter, mindre enn 40 minutter, mindre enn 30 minutter, mindre enn

20 minutter , mindre enn 10 minutter, mindre enn 5 minutter eller mindre enn 1 minutt;

(viii) dyrkningsmediet i trinn (a) produseres ved å tilsette en karbonkilde til nevnte dyrkningsmedium, og dyrke nevnte dyrkningsmedium inntil karbonkilden er utarmet;

(ix) dyrkningsmediet i trinn (a) produseres ved å tilsette en karbonkilde til dyrkningsmediet, og dyrke dyrkningsmediet inntil karbonkilden er oppbrukt, hvor karbonkilden omfatter en eller flere av: glyserol, glukose, etanol, sitrat, sorbitol, xylose, trehalose, arabinose, galaktose, fruktose, melibiose, laktose, maltose, rhamnose, ribose, mannose, mannitol og raffinose.

(x) dyrkningsmediet i trinn (a) produseres ved å tilsette en karbonkilde til nevnte dyrkningsmedium, og dyrke nevnte dyrkningsmedium inntil karbonkilden er utarmet, hvor utarming av karbonkilden bestemmes ved å påvise en reduksjon i den metabolske aktiviteten til nevnte *Pichia pastoris* celler;

(xi) dyrkningsmediet i trinn (a) produseres ved å tilsette en karbonkilde til nevnte dyrkningsmedium, og dyrke nevnte dyrkningsmedium inntil karbonkilden er utarmet, hvor utarming av karbonkilden bestemmes ved å påvise en reduksjon i den metabolske aktiviteten til nevnte *Pichia pastoris* celler, hvor nevnte reduksjon i den metabolske aktiviteten til nevnte *Pichia pastoris* celler identifiseres ved å oppdage en reduksjon i forbruket av oksygen ved nevnte *Pichia pastoris* celler, ved å påvise en økning i pH i dyrkningsmediet, ved å påvise stabilisering av den våte cellemassen, eller ved å påvise en økning i konsentrasjonen av ammoniakk i dyrkningsmediet; eller

(xii) dyrkningsmediet i trinn (a) produseres ved å tilsette en karbonkilde til nevnte dyrkningsmedium, og dyrke nevnte dyrkningsmedium inntil karbonkilden er utarmet hvor utarming av karbonkilden bestemmes ved å påvise en reduksjon i den metabolske aktiviteten til nevnte *Pichia pastoris* celler, hvor nevnte reduksjon i den metabolske aktiviteten til

- nevnte *Pichia pastoris* celler identifiseres ved å oppdage en reduksjon i forbruket av oksygen ved nevnte *Pichia pastoris* celler, ved å påvise en økning i pH i dyrkningsmediet, ved å påvise stabilisering av den våte cellemassen, eller ved å påvise en økning i konsentrasjonen av ammoniakk i dyrkningsmediet, hvor nevnte reduksjon i oksygenforbruket ved nevnte *Pichia pastoris* celler identifiseres ved å detektere en økning i konsentrasjonen av oppløst oksygen i dyrkningsmediet.
- 5
- 10 5. Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 1-4, hvor:
- (i) *Pichia pastoris* cellene omfatter gener integrert i deres genom som sørger for ekspresjon av antistoffet hvor genene er integrert i ett eller flere genomiske loci;
- (ii) *Pichia pastoris* cellene omfatter gener integrert i deres genom ved loci valgt fra gruppen bestående av pGAP-lokuset, 3' AOX TT-lokuset; PpURA5; OCH1; AOX1; HIS4; GAP; pGAP; 3' AOX TT; ARG; og HIS4 TT-lokuset;
- 15
- (iii) genene som koder for underenheterne til antistoffet uttrykkes under kontroll av en induserbar eller konstitutiv promoter;
- (iv) genene som koder for underenheterne til antistoffet uttrykkes under kontroll av en induserbar promoter valgt fra gruppen bestående av AOX1, CUP1, tetracyklin-induserbare, tiamin-induserbare og FLDI-promotere;
- 20
- (v) minst ett av genene som koder for nevnte underenheter av antistoffet er uttrykt under kontroll av en promoter valgt fra gruppen bestående av: CUP1, AOX1, ICL1, glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase (GAP), FLD1, ADH1, alkoholdehydrogenase II-, GAL4-, PHO3-, PHO5- og Pyk-promotere, tetracyklin-induserbare promotorer, tiamin-induserbare promotorer, kimære promotorer avledet derfra, gjær-promotorer, pattedyr-promotorer, insekt-promotorer, plante-
- 25
- 30

promotorer, reptil-promotorer, og amfibie-promotorer, virale promotorer, og fugle-promotorer; og/eller

(xi) *Pichia pastoris* cellene er diploide, tetraploide eller polyploide celler.

5

6. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1-5, videre omfattende minst én av følgende:

(i) rensing av antistoffet fra nevnte *Pichia pastoris* celler eller fra dyrkningsmediet;

10 (ii) rensing av antistoffet fra en intracellulær komponent, cytoplasma, nukleoplasma eller et membran fra nevnte *Pichia pastoris* celler;

(iii) *Pichia pastoris* cellene skiller ut antistoffet inn i dyrkningsmediet;

(iv) rensing av antistoffet fra dyrkningsmediet;

(v) antistoffet omfatter et monospesifikt eller bispesifikt antistoff;

15 (vi) antistoffet omfatter et humant antistoff eller et humanisert antistoff;

(vii) antistoffet omfatter et humanisert antistoff hvor det humaniserte antistoffet er av mus-, rotte-, kanin-, geit-, sau- eller ku-opprinnelse;

(viii) antistoffet omfatter et humanisert antistoff av kaninopprinnelse;

20 (ix) antistoffet omfatter et monovalent, bivalent eller multivalent antistoff;

(x) antistoffet renses fra dyrkningsmediet ved protein A og/eller protein G-affinitet;

25 (xi) minst ett av genene som sørger for ekspresjon av en underenhet av nevnte antistoff i minst ett av nevnte *Pichia pastoris* celler i panelet er optimalisert for ekspresjon i gjærcellen;

(xii) renheten til nevnte antistoff vurderes ved å måle fraksjonen av antistoffet produsert av nevnte gjærcele som er inneholdt i

30 antistoffkomplekser med forventet tilsynelatende hydrodynamisk radius, er inneholdt i antistoffkomplekser med forventet molekylvekt, og/eller spesifikt binder et mål av antistoffet;

- (xiii) utbyttet av nevnte antistoff vurderes ved å bestemme mengden antistoff produsert av nevnte gjærcele, med unntak av eventuelle produktassosierte varianter som er unormalt glykosylerte, inneholdt i andre antistoffkomplekser enn komplekser med den forventede tilsynelatende hydrodynamiske radius, inneholdt i antistoffkomplekser som har den forventede molekylvekten, og/eller som ikke klarer å binde spesifikt til målet til nevnte antistoff, og molekylvekten til nevnte antistoffkomplekser bestemmes eventuelt ved ikke-reduserende SDS-PAGE;
- (xiv) nevnte fremgangsmåte omfatter videre rensing av nevnte antistoff;
- (xv) kulturcellene produserer en supernatant antistofftiter på minst 100 mg/l, minst 150 mg/l, minst 200 mg/l, minst 250 mg/l, minst 300 mg/l, mellom 100 og 300 mg/l, mellom 100 og 500 mg/l, mellom 100 og 1000 mg/l, minst 1000 mg/l, minst 1250 mg/liter, minst 1500 mg/liter, minst 1750 mg/liter, kl. minst 2000 mg/liter, minst 10000 mg/liter eller mer;
- (xvi) én eller flere underenheter av antistoffet uttrykkes fra mer enn én genkopi;
- (xvii) antistoffet uttrykkes fra mellom 1-10 kopier av et gen som koder for den lette kjeden til antistoffet og fra 1-10 kopier av et gen som koder for den tunge kjeden til antistoffet, eventuelt integrert i genomet til nevnte celler;
- (xviii) genene som sørger for ekspresjon av antistoffet er inneholdt på et ekstrakromosomalt element, plasmid eller kunstig kromosom;
- (xix) *Pichia pastoris* cellene omfatter flere kopier av genet som sørger for ekspresjon av den lette kjeden til antistoffet enn kopier av genet som sørger for ekspresjon av den tunge kjeden til antistoffet;
- (xx) de dyrkede cellene omfatter flere kopier av genet som sørger for ekspresjon av den lette kjeden til nevnte antistoff enn kopier av genet som sørger for ekspresjon av den tunge kjeden til nevnte antistoff, hvor

det respektive antallet kopier av genet som koder for den tunge kjeden til nevnte antistoff og antall kopier av genet som koder for den lette kjeden til nevnte antistoff i nevnte celler er: 2 og 2, 2 og 3, 3 og 3, 3 og 4, 3 og 5, 4 og 3 4 og 4, 4 og 5, 4 og 6, 5 og 4, 5 og 5, 5 og 6, eller 5 og 7; og

(xxi) de dyrkede cellene omfatter flere kopier av genet som sørger for ekspresjon av den lette kjeden til nevnte antistoff enn kopier av genet som sørger for ekspresjon av den tunge kjeden til nevnte antistoff, og videre hvor det respektive antall kopier av genet som koder for den tunge kjeden til nevnte antistoff og antall kopier av genet som koder for den lette kjeden til nevnte antistoff i nevnte celler er: 2 og 1, 3 og 1, 4 og 1, 5 og 1, 6 og 1, 7 og 1, 8 og 1, 9 og 1, 10 og 1, 1 og 2, 2 og 2, 3 og 2, 4 og 2, 5 og 2, 6 og 2, 7 og 2, 8 og 2, 9 og 2, 10 og 2, 1 og 3, 2 og 3, 3 og 3, 4 og 3, 5 og 3, 6 og 3, 7 og 3, 8 og 3, 9 og 3, 10 og 3, 1 og 4, 2 og 4, 3 og 4, 4 og 4, 5 og 4, 6 og 4, 7 og 4, 8 og 4, 9 og 4, 10 og 4, 1 og 5, 2 og 5, 3 og 5, 4 og 5, 5 og 5, 6 og 5, 7 og 5, 8 og 5, 9 og 5, 10 og 5, 1 og 6, 2 og 6, 3 og 6, 4 og 6, 5 og 6, 6 og 6, 7 og 6, 8 og 6, 9 og 6, 10 og 6, 1 og 7, 2 og 7, 3 og 7, 4 og 7, 5 og 7, 6 og 7, 7 og 7, 8 og 7, 9 og 7, 10 og 7, 1 og 8, 2 og 8, 3 og 8, 4 og 8, 5 og 8, 6 og 8, 7 og 8, 8 og 8, 9 og 8, 10 og 8, 1 og 9, 2 og 9, 3 og 9, 4 og 9, 5 og 9, 6 og 9, 7 og 9, 8 og 9, 9 og 9, 10 og 9, 1 og 10, 2 og 10, 3 og 10, 4 og 10, 5 og 10, 6 og 10, 7 og 10, 8 og 10, 9 og 10, 10 og 10.

7. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvor:

- (i) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes i et produksjonsmedium;
- (ii) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes i et produksjonsmedium som omfatter et minimalt medium;
- (iii) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes i et produksjonsmedium som omfatter et minimalt medium som mangler selektive midler;

- (iv) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes i et produksjonsmedium som omfatter et minimalt medium som mangler forhåndsformede aminosyrer eller andre komplekse biomolekyler;
- (v) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes i et produksjonsmedium som omfatter et komplekst medium;
- (vi) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes i et produksjonsmedium som omfatter et komplekst medium som omfatter én eller flere av gjærekstrakt, soyapeptoner og andre plantepeptoner;
- (vii) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes til en høy celletetthet;
- (viii) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes til en celletetthet som er minst 50 g/l;
- (ix) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes til en celletetthet som er minst 100 g/l;
- (x) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes til en celletetthet som er minst 300 g/l;
- (xi) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes til en celletetthet som er minst 400 g/l;
- (xii) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes til en celletetthet som er minst 500 g/l;
- (xiii) dyrkningsmediet i trinn (c) dyrkes til en celletetthet som er minst 750 g/l;
- (xiv) *Pichia pastoris* cellene i trinn (c) dyrkes i minst 20 doblinger og opprettholder høye nivåer av ekspresjon av antistoffet etter de minst 20 doblingene;
- (xv) *Pichia pastoris* cellene i trinn (c) dyrkes i minst 50 doblinger og opprettholder høye nivåer av ekspresjon av antistoffet etter de minst 50 doblingene; eller
- (xvi) *Pichia pastoris* cellene fra trinn (c) dyrkes i minst 100 doblinger og opprettholder høye nivåer av ekspresjon av antistoffet etter de minst 100 doblingene.

8. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1-7, hvor minst én underenhet av antistoffet er kodet av et gen som omfatter et sekresjonssignal hvor valgfritt sekresjonssignalet omfatter ett eller flere polypeptider valgt fra gruppen bestående av: SEKV ID NR: 414 til 437 og enhver kombinasjon derav.

9. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvor multi-underenhetskomplekset ikke inneholder alle seks CDR-sekvensene av SEKV ID NR:5-10, ikke inneholder alle seks CDR-sekvensene av SEKV ID NR:15-20, ikke inneholder alle seks CDR-sekvenser av SEKV ID NR:25-30, inneholder ikke alle seks CDR-sekvenser av SEKV ID NR:35-40, inneholder ikke alle seks CDR-sekvenser av SEKV ID NR:45-50, inneholder ikke alle seks CDR-sekvenser av SEKV ID NR:55-60, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene til SEKV ID NR:65-70, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene til SEKV ID NR:75-80, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene av SEKV ID NR:85-90, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene av SEKV ID NR:95-100, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene til SEKV ID NR:105-110, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 115-120, inneholder ikke alle seks CDR-sekvenser av SEKV ID NR: 125-130, inneholder ikke alle seks CDR-sekvenser av SEKV ID NR:135-140, inneholder ikke alle seks CDR-sekvenser av SEKV ID NR:145-150, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene til SEKV ID NR:155-160, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene til SEKV ID NR:165-170, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene til SEKV ID NR:175-180, inneholder ikke alle seks CDR-sekvenser av SEKV ID NR:185-190, inneholder ikke alle seks CDR-sekvensene til SEKV ID NR:195-200.

10. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvor multiunderenhetskomplekset ikke er et anti-NGF-antistoff.

11. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 8 eller 10
5 hvor multi-underenhetskomplekset ikke inneholder minst én, minst to, minst tre, minst fire eller minst fem av CDR-ene inneholdt i noen av følgende antistoffer: et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR 5 -10, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 15-20, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 25-30, et antistoff
10 som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 35-40, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 45-50, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 55-60, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 65-70, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 75-80, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 85-90, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 95-100, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 105 -110, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 115-120, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 125-130, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: ID NR: 135-140, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 145-150, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 155-160, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 165- 170, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 175-180, et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 185-190, eller et antistoff som har CDR-sekvensene til SEKV ID NR: 195-200 og eventuelt har
20 bindingsspesifisitet for NGF.
25