

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento variable de cadena única aislada (scFv) que comprende:
 - a) una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), caracterizado porque el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
 - (ii) un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys; o
 - b) una VH, un L y una VL, en donde:
 - (i) la VH comprende una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende una primera L Cys;
 - (ii) la VL comprende una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende una segunda L Cys; o
 - (iii) la VH comprende la VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente, la VL comprende la VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende la primera L Cys y la segunda L Cys, en donde la VH Cys y la primera L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro y la VL Cys y la segunda L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro.
2. El scFv de la reivindicación 1, caracterizado porque:
 - a) la distancia entre la VH Cys y la VL Cys es de aproximadamente 7 Å a aproximadamente 9 Å;

- b) la VH Cys está en H3, H5, H40, H43, H46 o H105, en donde la numeración de los residuos es de acuerdo con Chothia; o
 - c) la VL Cys está en L3, L5, L39, L42, L45, L100 o L102, en donde la numeración de los residuos es de acuerdo con Chothia.
3. El scFv de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado porque:
- a) la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L42;
 - b) la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L100;
 - c) la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L3;
 - d) la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L5;
 - e) la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L39;
 - f) la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L42;
 - g) la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L45;
 - h) la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L100;
 - i) la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L102;
 - j) la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L3;
 - k) la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L5;
 - l) la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L39;
 - m) la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L42;
 - n) la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L45;
 - o) la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L100;
 - p) la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L102;
 - q) la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L3;
 - r) la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L5;
 - s) la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L39;
 - t) la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L42;
 - u) la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L45;
 - v) la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L100;
 - w) la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L102;
 - x) la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L3;
 - y) la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L5;
 - z) la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L39;

- aa) la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L42;
- bb) la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L45;
- cc) la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L102;
- dd) la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L3;
- ee) la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L5;
- ff) la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L39;
- gg) la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L42;
- hh) la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L45;
- ii) la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L100;
- jj) la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L102;
- kk) la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L3;
- ll) la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L5;
- mm) la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L39;
- nn) la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L45;
- oo) la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L100; o
- pp) la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L102; en donde la numeración de residuos es de acuerdo con Chothia;

4. El scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque:

- a) el L comprende una secuencia de aminoácidos contigua derivada de una región bisagra de una inmunoglobulina (Ig); opcionalmente en donde:
 - i) la región bisagra de la Ig se deriva de una región bisagra de la Ig humana o no humana; o
 - ii) la región bisagra de la Ig se deriva de la región bisagra de la Ig humana;
 en donde la región bisagra de la Ig humana es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4;
- b) el L comprende una secuencia de aminoácidos C(X)_yC (SEQ ID NO: 23), en donde X es glicina (Gly), serina (Ser), prolina (Pro), alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptófano (Trp) o tirosina (Tyr), y y es un

entero de 1 a 3; opcionalmente en donde, el L comprende una secuencia de aminoácidos $C(X)_yC$ (SEQ ID NO: 24), en donde X es Gly, Ser o Pro, y y es un entero de 1 a 3;

- c) el L comprende la secuencia de aminoácidos CPC, CGC, CSC, CPPC (SEQ ID NO: 1), CGPC (SEQ ID NO: 28), CPGC (SEQ ID NO: 29), CGGC (SEQ ID NO: 30), CSPG (SEQ ID NO: 31), CPSC (SEQ ID NO: 32), CSSC (SEQ ID NO: 33), CGSC (SEQ ID NO: 34), CSGC (SEQ ID NO: 35), CPPPC (SEQ ID NO: 36), CGPPC (SEQ ID NO: 37), CPGPC (SEQ ID NO: 38), CPPGC (SEQ ID NO: 39), CGGPC (SEQ ID NO: 40), CPGGC (SEQ ID NO: 41), CGGGC (SEQ ID NO: 42), CSPPC (SEQ ID NO: 43), CPSPC (SEQ ID NO: 44), CPPSC (SEQ ID NO: 45), CSSPC (SEQ ID NO: 46), CPSSC (SEQ ID NO: 47), CSSSC (SEQ ID NO: 48), CGSPC (SEQ ID NO: 49), CPGSC (SEQ ID NO: 50), CSGPC (SEQ ID NO: 51) o CPSGC (SEQ ID NO: 52);
- d) el L comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 19 aminoácidos, tal como aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18 o aproximadamente 19 aminoácidos;
- e) el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (SEQ ID NO: 25); en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6; opcionalmente en donde:
 - i) el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (SEQ ID NO: 26); en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6; o
 - ii) el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (SEQ ID NO: 27); en donde X es Gly o Pro, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6;
- f) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7;
- o
- g) el scFv está en la orientación VL-L-VH.

5. Un scFv que comprende:

- a) una VH, un L y una VL, caracterizado porque:
 - i) la VH comprende Cys en H105;
 - ii) la VL comprende Cys en L42;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VL-L-VH;
- b) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H105;
 - ii) la VL comprende Cys en L39;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VL-L-VH;
- d) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H5;
 - ii) la VL comprende Cys en L42;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VL-L-VH;
- e) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H5;
 - ii) la VL comprende Cys en L45;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VL-L-VH;
- f) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H5;
 - ii) la VL comprende Cys en L39;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VL-L-VH;

- g) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H3;
 - ii) la VL comprende Cys en L42;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VL-L-VH;
- h) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H3;
 - ii) la VL comprende Cys en L45;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VL-L-VH;
- i) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H3;
 - ii) la VL comprende Cys en L39;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VL-L-VH;
- j) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H43;
 - ii) la VL comprende Cys en L100;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
- k) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H43;
 - ii) la VL comprende Cys en L102;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
- l) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H43;

- ii) la VL comprende Cys en L5;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
- m) una VH, un L y una VL, en donde:
- i) la VH comprende Cys en H43;
 - ii) la VL comprende Cys en L3;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
- n) una VH, un L y una VL, en donde:
- i) la VH comprende Cys en H40;
 - ii) la VL comprende Cys en L100;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
- o) una VH, un L y una VL, en donde:
- i) la VH comprende Cys en H40;
 - ii) la VL comprende Cys en L102;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
- p) una VH, un L y una VL, en donde:
- i) la VH comprende Cys en H40;
 - ii) la VL comprende Cys en L5;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
- q) una VH, un L y una VL, en donde:
- i) la VH comprende Cys en H40;
 - ii) la VL comprende Cys en L3;

- iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
 - r) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H46;
 - ii) la VL comprende Cys en L100;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
 - s) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H46;
 - ii) la VL comprende Cys en L102;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
 - t) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H46;
 - ii) la VL comprende Cys en L5;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
 - o
 - u) una VH, un L y una VL, en donde:
 - i) la VH comprende Cys en H46;
 - ii) la VL comprende Cys en L3;
 - iii) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - iv) el scFv está en la orientación VH-L-VL.
6. El scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque:
- a) el L comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
 - b) el L comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; o

- c) el L comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.
7. El scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el scFv se conjuga con una segunda molécula; opcionalmente en donde:
- a) la segunda molécula es una entidad que prolonga la vida media; opcionalmente en donde, la entidad que prolonga la vida media es una inmunoglobulina (Ig), un fragmento de la Ig, una región constante de Ig, un fragmento de la región constante de Ig, una región Fc, transferrina, albúmina, un dominio de unión a albúmina o polietilenglicol;
 - b) la segunda molécula es:
 - i) un agente citotóxico;
 - ii) una etiqueta detectable;
 - iii) un anticuerpo o fragmento de este; opcionalmente en donde, el scFv y el anticuerpo o el fragmento de este se unen a antígenos distintos; o
 - iv) receptor de antígeno quimérico (CAR).
8. Una composición farmacéutica que comprende el scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Un polinucleótido que codifica el scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9.
11. Una línea de células huésped que comprende el vector de la reivindicación 10.
12. Un método para producir el scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 11 en condiciones en las que se produce el scFv, y purificar el scFv; opcionalmente en donde, la célula huésped es una célula procariota o una célula eucariota.

13. Un anticuerpo antiidiotipo que se une al scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
14. Un kit que comprende el scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
15. Una molécula multiespecífica que comprende el scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
16. La molécula multiespecífica de la reivindicación 15, caracterizada porque la molécula multiespecífica comprende:
 - a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo; o
 - b) una región constante de Ig o un fragmento de la región constante de Ig; opcionalmente en donde, el fragmento de la región constante de Ig comprende:
 - i) una región Fc;
 - ii) un dominio CH2;
 - iii) un dominio CH3;
 - iv) un dominio CH2 y un dominio CH3;
 - v) al menos una porción de una bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3; o
 - vi) la bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3.
17. La molécula multiespecífica de la reivindicación 16, caracterizada porque el scFv:
 - a) se conjuga con el N-terminal de la región constante de Ig o con el N-terminal del fragmento de la región constante de Ig; o
 - b) se conjuga con el C-terminal de la región constante de Ig o con el N-terminal del fragmento de la región constante de Ig.
18. La molécula multiespecífica de la reivindicación 16 o la reivindicación 17, caracterizada porque:
 - a) la región constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig es un isotipo IgG1, IgG2, e IgG3 o IgG4;

- b) la región constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig comprende al menos una mutación que da como resultado la unión reducida de la molécula multiespecífica al FcγR; opcionalmente en donde, la al menos una mutación que da como resultado la unión reducida de la molécula multiespecífica a FcγR se selecciona del grupo que consiste en F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/G236-delecionada/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S y S228P/F234A/L235A/G236-delecionada/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU;
- c) la región constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig comprende al menos una mutación que da como resultado la unión potenciada de la molécula multiespecífica al FcγR; opcionalmente en donde, la al menos una mutación que da como resultado la unión potenciada de la molécula multiespecífica al FcγR se selecciona del grupo que consiste en S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L y G236A/S239D/I332E, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU;
- d) la región constante de Ig o fragmento de la región constante de Ig comprende al menos una mutación que modula una vida media de la molécula multiespecífica; opcionalmente en donde, la al menos una mutación que modula la vida media de la molécula multiespecífica se selecciona del grupo que consiste en H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A y H435R, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU; o
- e) la región constante de Ig o fragmento de la región constante de Ig comprende al menos una mutación en el dominio CH3; opcionalmente en donde, la al

menos una mutación en el dominio CH3 se selecciona del grupo que consiste en T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V y T350V/T366L/K392L/T394W, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

19. La molécula multiespecífica de la reivindicación 18, caracterizada porque el FcγR es FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIII, o cualquier combinación de estos.
20. La molécula multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, caracterizada porque:
 - a) la molécula multiespecífica es biespecífica;
 - b) la molécula multiespecífica es trispecífica; o
 - c) la molécula multiespecífica es tetraespecífica.
21. Una composición farmacéutica que comprende la molécula multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20 y un portador farmacéuticamente aceptable.
22. Una molécula heteróloga que comprende el scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
23. La molécula heteróloga de la reivindicación 22, caracterizada porque el scFv se conjuga con una segunda proteína, un polinucleótido, un agente terapéutico, un agente citotóxico o una etiqueta detectable; opcionalmente en donde, la segunda proteína es:
 - a) un anticuerpo o un fragmento de este;
 - b) un supercóntigo alternativo; o
 - c) un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un fragmento de este.

24. La molécula heteróloga de la reivindicación 22 o la reivindicación 23, caracterizada porque la molécula heteróloga es:
- a) monoespecífica;
 - b) multiespecífica;
 - c) biespecífica;
 - d) triespecífica; o
 - e) tetraespecífica.
25. Una composición farmacéutica que comprende la molécula heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 y un portador farmacéuticamente aceptable.
26. Un proceso para preparar un scFv estabilizado, que comprende:
- a)
 - (i) proporcionar una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) que forman un dominio de unión al antígeno;
 - (ii) proporcionar un enlazador (L) que comprende o se modifica genéticamente para que comprenda una primera L Cys;
 - (iii) modificar genéticamente la VH para que comprenda una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y
 - (iv) formar un enlace disulfuro entre la VH Cys y la primera L Cys para preparar el scFv estabilizado.
 - b)
 - (i) proporcionar una VH y una VL que forman un dominio de unión al antígeno;
 - (ii) proporcionar un L que comprende o se modifica genéticamente para que comprenda una segunda L Cys;
 - (iii) modificar genéticamente la VL para que comprenda una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y

- (iv) formar un enlace disulfuro entre la VL Cys y la segunda L Cys para preparar el scFv estabilizado. o proporcionar una VH y una VL que forman un dominio de unión al antígeno; o
- c)
 - (i) proporcionar un L que comprende o se modifica genéticamente para que comprenda una primera L Cys y una segunda L Cys;
 - (ii) modificar genéticamente la VH para que comprenda una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente;
 - (iii) modificar genéticamente la VL para que comprenda una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y
 - (iv) formar un enlace disulfuro entre la VH Cys y la primera L Cys y un enlace disulfuro entre la VL Cys y la segunda L Cys para preparar el scFv estabilizado.
- 27. El proceso de la reivindicación 26, caracterizado porque el scFv estabilizado:
 - a) es el scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; o
 - b) se une a un antígeno con afinidad comparable en comparación con un scFv de control que carece de los enlaces disulfuro.
- 28. Un proceso para preparar un scFv estabilizado, que comprende:
 - a) proporcionar un polinucleótido que codifica una VH, un L y una VL, caracterizado porque
 - i. la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L42;
 - ii. la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en un L100;
 - iii. la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L3;
 - iv. la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L5;
 - v. la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L39;
 - vi. la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L42;

- vii. la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L45;
- viii. la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L100;
- ix. la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L102;
- x. la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L3;
- xi. la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L5;
- xii. la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L39;
- xiii. la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L42;
- xiv. la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L45;
- xv. la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L100;
- xvi. la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L102;
- xvii. la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L3;
- xviii. la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L5;
- xix. la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L39;
- xx. la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L42;
- xxi. la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L45;
- xxii. la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L100;
- xxiii. la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L102;
- xxiv. la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L3;
- xxv. la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L5;
- xxvi. la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L39;
- xxvii. la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L42;
- xxviii. la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L45;
- xxix. la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L102;
- xxx. la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L3;
- xxxi. la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L5;
- xxxii. la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L39;
- xxxiii. la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L42;
- xxxiv. la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L45;
- xxxv. la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L100;
- xxxvi. la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L102;
- xxxvii. la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L3;
- xxxviii. la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L5;

- xxxix. la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L39;
 - xl. la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L45;
 - xli. la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L100;
o
 - xlii. la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L102,
en donde la numeración de residuos es de acuerdo con Chothia;
 - b) el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de
ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
 - c) expresar el polinucleótido en una célula huésped para producir el scFv
estabilizado.
29. El proceso de la reivindicación 28, caracterizado porque la célula huésped es
una célula procariota o una célula eucariótica.
30. Un fragmento variable de cadena única aislada (scFv) que comprende:
- a) una región variable de cadena pesada (VH), un medio para enlazar (L) y una
región variable de cadena ligera (VL), caracterizado porque el scFv
comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta
en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
 - (ii) un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la
superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie
conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo
enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie
conservada estructuralmente y la segunda L Cys;
 - b) un medio para la unión al antígeno, un enlazador (L) y una región variable de
cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una cisteína (Cys) del medio de unión
al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y
una primera L Cys;

- (ii) un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
- (iii) el primer enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys; o
- c) una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y un medio para la unión al antígeno, en donde el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
 - (ii) un segundo enlace disulfuro entre una Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

31. Una molécula multiespecífica que comprende:

- a) un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un medio para enlazar (L) y una región variable de cadena ligera (VL), caracterizada porque el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
 - (ii) un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys;

- b) un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un medio para la unión al antígeno, un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una cisteína (Cys) del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
 - (ii) un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys; o
 - c) un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y un medio para la unión al antígeno, en donde el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
 - (ii) un segundo enlace disulfuro entre una Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.
32. Una molécula heteróloga que comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende:
- a) una región variable de cadena pesada (VH), un medio para enlazar (L) y una región variable de cadena ligera (VL), caracterizada porque el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;

- (ii) un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys;
 - b) un medio para la unión al antígeno, un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una cisteína (Cys) del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
 - (ii) un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys; o
 - c) una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y un medio para la unión al antígeno, en donde el scFv comprende:
 - (i) un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
 - (ii) un segundo enlace disulfuro entre una Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
 - (iii) el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.
33. Un medio para codificar el scFv de la reivindicación 31 o la reivindicación 32.
34. Un medio para replicar el scFv de la reivindicación 33.

35. Una composición que comprende un medio:

- a) para estabilizar un scFv; o
- b) para aumentar la termoestabilidad de un scFv;

opcionalmente caracterizada porque, el medio incluye formar un enlace disulfuro entre una VH y un L, entre una VL y el L, o entre la VH y el L y entre la VL y el L.

36. Una molécula multiespecífica que comprende:

- a) un medio para estabilizar un scFv; o
- b) un medio para aumentar la termoestabilidad de un scFv;

opcionalmente caracterizada porque, el medio incluye formar un enlace disulfuro entre una VH y un L, entre una VL y el L, o entre la VH y el L y entre la VL y el L.

37. Una molécula heteróloga que comprende:

- a) un medio para estabilizar un scFv o
- b) un medio para aumentar la termoestabilidad de un scFv;

opcionalmente caracterizada porque, el medio incluye formar un enlace disulfuro entre una VH y un L, entre una VL y el L, o entre la VH y el L y entre la VL y el L.

38. Un medio para producir:

- a) la composición de la reivindicación 35;
- b) la molécula multiespecífica de la reivindicación 36; o
- c) la molécula heteróloga de la reivindicación 37.