

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/31 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680052351.0

[43] 公开日 2008 年 12 月 31 日

[11] 公开号 CN 101336250A

[22] 申请日 2006.12.5

[21] 申请号 200680052351.0

[30] 优先权

[32] 2005.12.5 [33] GB [31] 0524788.7

[86] 国际申请 PCT/EP2006/011669 2006.12.5

[87] 国际公布 WO2007/065635 英 2007.6.14

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.5

[71] 申请人 阿菲博迪公司

地址 瑞典布鲁玛

[72] 发明人 F·尼尔森 T·埃里克松

A·荣森 S·斯托尔

M·弗里德曼

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

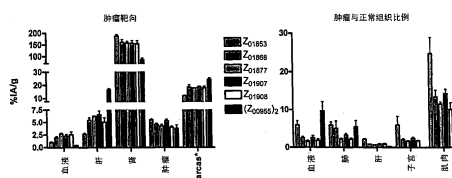
权利要求书 8 页 说明书 46 页 序列表 100 页
附图 28 页

[54] 发明名称

多肽

[57] 摘要

本发明涉及结合 EGFR 家族受体的多肽并涉及
这些多肽在医药、兽医、诊断剂和成像中的应用。



1.表皮生长因子受体(EGFR)结合多肽,其包含表皮生长因子受体结合基序EBM,该基序由选自如下的氨基酸序列组成:

i) $EX_2X_3X_4AX_6X_7EIX_{10}X_{11}LPNLNX_{17}X_{18}QX_{20}X_{21}AFIX_{25}SLX_{28}D$,

其中,彼此相互独立地,

X_2 选自 M, F, V, L, I 和 S;

X_3 选自 W, D, E 和 L;

X_4 选自 I, V, G, S, M, L, A, T, N, D 和 W;

X_6 选自 W, V, L, I, M 和 S;

X_7 选自 D, E, N 和 K;

X_{10} 选自 R, G, H 和 K;

X_{11} 选自 D, N, E, Y 和 S;

X_{17} 选自 G, W 和 A;

X_{18} 选自 W, G 和 A;

X_{20} 选自 M, L, F, A 和 E;

X_{21} 选自 T, D, N, A 和 Q;

X_{25} 选自 A, S, N, G 和 L; 和

X_{28} 选自 L, W, V, F 和 A;

和

ii)与 i)中定义序列具有至少 85%相同性的氨基酸序列;

EGFR 结合多肽与 EGFR 结合,因此相互作用的 K_D 值至多是 $10\mu M$ 。

2.权利要求 1 的 EGFR 结合多肽,其中 X_2 是 M。

3.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽,其中 X_3 是 W。

4.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽,其中 X_4 选自 I, V, G 和 S。

5.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽,其中 X_6 选自 V 和 W。

6.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽,其中 X_{10} 选自 R 和 G。

- 7.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{11} 选自 D, N 和 E。
- 8.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{17} 选自 W 和 G。
- 9.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{18} 选自 W 和 G。
- 10.权利要求 9 的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{18} 是 W。
- 11.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{20} 是 M。
- 12.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{21} 选自 T 和 D。
- 13.权利要求 12 的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{21} 是 T。
- 14.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{25} 选自 A, S 和 N。
- 15.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{28} 选自 L 和 W。
- 16.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{18} 是 W 和 X_{21} 是 T。
- 17.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中 X_{18} 是 W 和 X_{20} 是 M。
- 18.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中氨基酸序列 i) 满足如下 9 种条件 I-IX 中的至少 6 种:
 - I) X_2 是 M;
 - II) X_3 是 W;
 - III) X_6 是 W;
 - IV) X_{10} 是 R;
 - V) X_{17} 是 G;
 - VI) X_{18} 是 W;
 - VII) X_{20} 是 M;
 - VIII) X_{21} 是 T;
 - IX) X_{28} 是 L。
- 19.权利要求 18 的 EGFR 结合多肽, 其中氨基酸序列 i) 满足 9 种条件 I-IX

中的至少 7 种。

20.权利要求 19 的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i)满足 9 种条件 I-IX 中的至少 8 种。

21.权利要求 20 的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i)是
EMWX₄AWX₇EIR X₁₁LPNLNGWQM TAFIX₂₅SLLD。

22.权利要求 1-17 任一项的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i)满足如下 5 种条件 V-VIII 和 X 中的至少 3 种:

V) X₁₇ 是 G;

VI) X₁₈ 是 W;

VII) X₂₀ 是 M;

VIII) X₂₁ 是 T;

X) X₂₅ 是 A。

23.权利要求 22 的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i) 满足如下 5 种条件 V-VIII 和 X 中的至少 4 种。

24.权利要求 23 的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i)是
EX₂X₃X₄AX₆X₇EIX₁₀ X₁₁LPNLNGWQM TAFIASLX₂₈D。

25.权利要求 1-17 任一项的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i)是
EX₂X₃X₄AX₆X₇EIG X₁₁LPNLNWGQX₂₀ X₂₁AFIX₂₅SLWD。

26.权利要求 25 的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i)是
EX₂X₃IAX₇EIG ELPNLNWGQX₂₀ DAFINSLWD。

27.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i)选自 SEQ ID NO: 1-163。

28.权利要求 27 的 EGFR 结合多肽,其中氨基酸序列 i)选自 SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:88 和 SEQ ID NO:147。

29.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽, 其中所述 EGFR 结合基序形成 3-螺旋束蛋白质结构域的一部分。

30.权利要求 29 的 EGFR 结合多肽, 其中所述 EGFR 结合基序基本上形成位于所述 3-螺旋束蛋白质结构域内的 2 个 α 螺旋和连接它们的环的一部分。

31.权利要求 30 的 EGFR 结合多肽, 其中所述 3-螺旋束蛋白质结构域选自细菌受体蛋白质的结构域。

32.权利要求 31 的 EGFR 结合多肽, 其中所述 3-螺旋束蛋白质结构域选自金黄色葡萄球菌蛋白质 A 的结构域或其衍生物。

33.权利要求 32 的 EGFR 结合多肽, 其包含选自如下的氨基酸序列:

ADNNFNK-[EBM]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK;

ADNKFNK-[EBM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK;

ADNKFNK-[EBM]-DPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK;

ADAQQNNFNK-[EBM]-DPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK;

AQHDE-[EBM]-DPSQSANVLGEAQKLNDSQAPK;和

VDNKFNK-[EBM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK;

其中[EBM]是如权利要求 1-28 任一项定义的 EGFR 结合基序。

34. EGFR 结合多肽, 其包含衍生自如下氨基酸序列 SEQ ID NO:327 的氨基酸序列:

VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK, 所述衍生的氨基酸序列通过在上述序列的第 9 到 11、13 到 14、17 到 18、24 到 25、27 到 28、32 和 35 位中的任一或所有位置或相应于这些位置的位置上包含氨基酸取代而衍生, 与包含未修饰氨基酸序列的多肽比较, 所述取代改良了多肽与 EGFR 的结合, 其中 EGFR 结合多肽与 EGFR 结合, 因此相互作用的 K_D 值至多是 $10\mu\text{M}$ 。

35. EGFR 结合多肽, 其氨基酸序列包含满足选自如下一个定义的序列:

iii)其选自 SEQ ID NO: 164-326;

iv)其是与选自 SEQ ID NO:164-326 的序列具有 85%或更高相同性的氨基酸序列。

36.权利要求 35 的 EGFR 结合多肽,其氨基酸序列包含满足选自如下的一个定义的序列:

v)其选自 SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 和 SEQ ID NO:310;

vi)其是与选自 SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 和 SEQ ID NO:310 的序列具有 85%或更高相同性的氨基酸序列。

37.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽,其通过 C 末端和/或 N 末端氨基酸而被延伸。

38.权利要求 37 的 EGFR 结合多肽,其中所述或每个氨基酸延伸增强多肽与 EGFR 的结合。

39.权利要求 37 或 38 的 EGFR 结合多肽,其中所述或每个氨基酸延伸改良多肽的生产、纯化、体内和体外稳定性、偶联或检测。

40.权利要求 39 的 EGFR 结合多肽,其中延伸包含链球菌蛋白质 G 的白蛋白结合结构域或其衍生物,在治疗应用中其改良了 EGFR 结合多肽的半衰期。

41.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽,其与 EGFR 结合,因此相互作用的 K_D 值至多是 1×10^{-6} M。

42.权利要求 41 的 EGFR 结合多肽,其与 EGFR 结合,因此相互作用的 K_D 值至多是 1×10^{-7} M。

43.前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽,其与 EGFR 胞外结构域结合。

44.权利要求 43 的 EGFR 结合多肽,其与相应于 SEQ ID NO: 329 的

EGFR 的胞外结构域的一部分结合。

45. EGFR 结合多肽，其包含前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽的片段。

46. 权利要求 45 的 EGFR 结合多肽，其中所述片段包含权利要求 1-44 任一项的多肽的 N 末端减少。

47. 权利要求 46 的 EGFR 结合多肽，其中 N 末端减少最多 4 个氨基酸。

48. 多聚体形式的前述权利要求任一项的 EGFR 结合多肽，其包含至少 2 个 EGFR 结合多肽单体单位，其氨基酸序列可以相同或不同。

49. 权利要求 48 的 EGFR 结合多肽，其中 EGFR 结合多肽单体单位共价偶联在一起。

50. 权利要求 49 的 EGFR 结合多肽，其中 EGFR 结合多肽单体单位表达为融合蛋白。

51. 二聚体形式的权利要求 48-50 任一项的 EGFR 结合多肽。

52. 多核苷酸，其编码前述权利要求任一项的多肽。

53. 生产权利要求 1-51 任一项的多肽的方法，所述方法包括表达权利要求 52 的多核苷酸。

54. 权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽和可检测物质的组合。

55. 权利要求 54 的组合，其中可检测物质是用于放射成像的放射性物质。

56. 权利要求 55 的组合，其中放射性物质是放射性核素。

57. 权利要求 54 的组合，其中可检测物质是酶。

58.权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽和治疗药物的组合。

59.权利要求 54-58 任一项的组合,其中 EGFR 结合多肽和可检测物质或治疗药物共价偶联在一起。

60.权利要求 54-59 任一项的组合,其中 EGFR 结合多肽和可检测物质或治疗药物表达为融合蛋白。

61.放射成像方法,其中权利要求 54-60 任一项的组合被用作放射成像物质。

62.检测 EGFR 的方法,包括提供疑似含有 EGFR 的样品,将样品与权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽或权利要求 54-60 任一项的组合相接触并检测所述多肽或组合的结合以指示样品中 EGFR 的存在。

63.从样品分离或捕获 EGFR 的方法,所述方法包括将样品与权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽或权利要求 54-60 任一项的组合相接触,由此 EGFR 与多肽结合并从样品中去除。

64.确定哺乳动物对象中 EGFR 存在的诊断方法,所述方法包括将所述对象或来源于对象的样品与权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽或权利要求 54-60 任一项的组合相接触并检测所述多肽或组合的结合。

65.权利要求 64 的方法,其中所述对象是人类。

66.权利要求 64 或 65 的方法,其中在体内进行所述方法。

67.权利要求 64 或 65 的方法,其中在体外的样品上进行所述方法。

68.治疗哺乳动物对象内或来源于哺乳动物对象的材料中的 EGFR 相关病症的方法,其中所述对象或材料用权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽或权利要求 58-60 任一项的组合处理。

69.权利要求 68 的治疗方法,其中所述 EGFR 结合多肽或所述组合与所

述对象或材料中的 EGFR 的结合抑制或刺激受体的活化。

70.权利要求 68 或 69 的治疗方法，其中 EGFR 结合多肽与所述对象的或材料中的 EGFR 的结合抑制细胞信号传导。

71.权利要求 68-70 任一项的治疗方法，其中 EGFR 相关病症是癌症。

72.权利要求 71 的治疗方法，其中癌症选自肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、头颈癌。

73.权利要求 68-72 任一项的方法，其中所述对象是人类。

74.权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽用作药物。

75.权利要求 54-60 任一项的组合用作药物。

76.权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽用作诊断药物。

77.权利要求 54-60 任一项的组合用作诊断药物。

78.权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽或权利要求 54-60 任一项的组合在制备用于体内诊断癌症的诊断药物中的应用。

79.权利要求 1-51 任一项的 EGFR 结合多肽或权利要求 54-60 任一项的组合在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

多肽

发明领域

本发明涉及结合表皮生长因子受体(EGFR)的多肽。该多肽在医药学、兽医学、成像、分离技术和诊断学中具有工业应用。

背景

在表皮生长因子受体家族中(EGFR-家族,也称为ErbB受体家族),受体异常表达通常与肺、胸、前列腺、结肠、卵巢、头和颈的各种恶性肿瘤相关。研究该受体家族以获得对受体与病人预后和治疗之间联系的更好理解,这是令人感兴趣的。该家族由四个跨膜受体组成,表皮生长因子受体EGFR(ErbB1/HER1)、HER2(ErbB2/neu)、HER3(ErbB3)和HER4(ErbB4)(Gullick WJ. *Endocr Rel Canc* 2001; 8:75-82; Witton CJ. et al *J Pathol* 2003; 200:290-297)。每个受体包含细胞外配体结合结构域,跨膜结构域和细胞内酪氨酸激酶结构域(除了HER3,其缺少功能性酪氨酸激酶结构域)(Citri A, et al. *Exp Cell Res* 2003; 284 (1) : 54-65; Harari D and Yarden Y. *Oncogene* 2002; 19:6102-6114)。存在一个几乎没有ECD-EGFRvIII的EGFR变体, Wikstrand CJ et al *Cancer Res.* 55: 3140-3148, 1995; Huang HS et al *J Biol. Chem.* 272: 2927-2935, 1997; Kuan CT, et al *Endocr. Relat. Cancer* 8:83-96, 2001。

当配体与EGFR家族的受体结合,受体被刺激形成二聚体,或者与另一个同样受体结合(同二聚化)或者与家族内的另一个受体结合(异二聚化)(Olayioye MA, et al. *Embo J.* 2000; 19:3159-67; Yarden Y, Sliwkowski MX. *Cell Biol* 2001; 2:127-37)。受体二聚化激活细胞内酪氨酸激酶结构域,导致增殖、迁移、凋亡、分化或其他细胞过程(Yarden Y, Sliwkowski MX. *Cell Biol* 2001; 2:127-37; Wells A. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:637-643; Vermeer PD et al. *Nature* 2003; 422:322-6)。EGFR和HER2是家族4个受体中研究最多的受体并且在许多恶性肿瘤中过表达。(Nordberg E et al. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005 Jul; 32 (7): 771-7)。这些特定受体的高表达通常与预后不良相关。(Hendriks BS et al. *J Biol Chem* 2003; 278:23343-23351; Arteaga CL.

Oncologist 2002; 7 Suppl 4:31-9; Earp HS et al. Breast Cancer Res Treat 1995; 35:115-32; Wester K, et al. Acta Oncol 2002; 41:282-8. Lorenzo GD et al. Clin Prostate Cancer 2003; 2(1):50-7)。

几个配体与 EGFR 受体家族成员相结合。没有任何已知天然配体的唯一受体是 HER2。(Citri A, et al. Exp Cell Res 2003; 284 (1):54-65; Yarden Y, Sliwkowski MX. Cell Biol 2001; 2:127-37; Lenferink AEG, et al. EMBO J 1998; 17:3385-3397)。与细胞外结构域结合的抗体 trastuzumab (Herceptin) 可被用于靶定 HER2 受体, 特别是在乳腺癌的 HER2 表达肿瘤中。trastuzumab 的结合可阻断生长刺激性胞内信号传导, 减少化疗和放疗后细胞修复能力和也可能改良凋亡能力。Bookman MA et al. J Clin Oncol 2003; 21:283-290; Pegram MD et al. Cancer Treat Res 2000; 103:747-75; McKeage K, Perry CM. Drugs 2002; 62:209-43)。在 W02005/003156 中揭示的 affibody 分子也可用于靶定 HER2。

使用抗体例如 cetuximab (Erbix, ImClone/ Bristol Myers Squibb) (Baselga J. Eur J Cancer 37: Suppl 4, S16-22, 2001, ABX-EGF Ranson M, Curr Opin Mol Ther 5: 541-546, 2003 或 mab425/EMD55900(Merck)或抗体片段 (Boskovitz A et al: Expert Opin Biol Ther 4: 1453-1471, 2004), 通过阻断配体结合受体胞外部分可以抑制 EGFR 功能。在一些但不是所有病人中, 使用低分子量酪氨酸激酶抑制剂如结合受体的胞内部分的 Iressa (Gefitinib, AstraZeneca) (Sundberg AL et al: Eur J Nucl Med Mol Imaging 30: 1348-1356, 2003; Herbst RS et al: Nat Rev Cancer 4: 956-965, 2004)或 Tarceva (Erlotinib, OSI-774) (Krozely P. Clin J Oncol Nurs 8: 163-168, 2004)也可阻断受体功能。在两种情况中, 目的是阻断生长刺激信号传导, 并因此抑制肿瘤细胞增殖 (Rich JN, Bigner DD: Nat Rev Drug Discov 3: 430-446, 2004)。但是, 仍存在改良的空间。例如, 由于在一小部分过表达 EGFR 的病人中起作用, 已证实 Iressa 令人失望。对于 cetuximab, 其仍然是可增加治疗效果的最佳化疗联合治疗药征。这些治疗结合基于放疗的方法可杀死肿瘤细胞(Carlsson J, et al: Radiotherapy and Oncology, 66(2), 107-117, 2003), 一个有趣的实例是近来应用 Gefitinib 可修饰放射标记的 (破标记的) EGF 的吸收和治疗效果 (Sundberg AL et al: Eur J Nucl Med Mol Imaging 30: 1348-1356, 2003)。为诊断 (成像) 和治疗目的输送放射性核素, 多肽抗 EGFR 靶向物质的发展为

天然激动性（肿瘤刺激性）生物学 EGF 配体提供了令人感兴趣的选择，如先前关于 HER-2 所述(Wikman M et al. Protein Engineering, Design & Selection (PEDS), 17(5), 455-462, 2004; Steffen AC et al. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 20, 239-248, 2005; Steffen AC et al. Eur J Nuclear Medicine, In press, 2005)。这样的多肽也具有生物学作用，甚至没有放射性，对于治疗也是令人感兴趣的。如 WO2005/0003156 所揭示，Z 变体，也称为“Affibody®分子”是分子量（6-15kDa）中间产物，因此在肿瘤组织中比抗体（150kDa）具有更好的穿透性，同时比通过肾排泄被快速清除的低分子量物质如 Iressa 和 Tarceva ($\approx 1\text{kDa}$)具有更好的体循环特性。事实上，Z 变体典型地具有范围适于体内成像应用的半衰期，并且若治疗或其他应用需要，通过基因融合技术可显著延长半衰期（见例如 WO 2005/097202A）。

通常在头颈鳞状细胞癌(HNSCC)中 EGFR 过表达(Rikimaru, K et al. Head Neck, 1992. 14(1): p. 8-13; Santini, J et al, Head Neck, 1991. 13(2): p. 132-9. Ekberg T et al. Int J Oncology, 26(5), 1177-1185, 2005)。在一些 HNSCC 的研究中已提示 HER2 水平增加(Craven, J. M et al. Anticancer Res, 1992. 12(6B): p. 2273-6)，在口腔鳞状细胞癌（SCC）中具有可能的预后价值(Werkmeister, et al. Oral Oncol, 2000. 36(1): p. 100-5; Werkmeister, R. Am J Surg, 1996. 172(6): p. 681-3; Xia, W et al. Clin Cancer Res, 1997. 3(1): p. 3-9; Xia, W et al. Clin Cancer Res, 1999. 5(12): p. 4164-74)。HER3 显示在 HNSCC 细胞系中过表达并与临床恶性进展相关 (Xia, W et al. Clin Cancer Res, 1999. 5(12): p. 4164-74; Shintani, S et al. Cancer Lett, 1995. 95(1-2): p. 79-83)并且也在其他类型的恶性肿瘤中过表达(Gullick, W.J. Cancer Surv, 1996. 27: p.339-49)。一些人乳腺癌细胞系有 HER4 转录物(Plowman, G. D et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(5): p.1746-50) 但是 HER4 在癌症中的作用不甚清楚(Srinivasan, R. et al. Cancer Res, 2000. 60(6): p.1483-7)。研究四个受体的共表达是非常有趣的，因为已经有提示共表达模式可能与恶性表型相关(Xia, W et al. Clin Cancer Res, 1999. 5(12): p.4164-74; Bei, R. et al. J Pathol, 2001. 195(3): p.343-8; Krahn, G. et al. Eur J Cancer, 2001. 37(2): p. 251-9)。EGFR 和 HER2 的免疫组化染色显示明显的膜着色。相反，HER3 和 HER4 染色主要在胞质中(Plowman, G. D et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(5): p. 1746-50; Srinivasan, R. et al. Cancer Res, 2000. 60(6): p.1483-7)。而且，已

经报道在肿瘤和转移癌中, EGFR 和 HER2 高水平表达。因此, 似乎 EGFR 和 HER2 是基于大分子和肽的体内成像和治疗应用的潜在靶位, 然而 HER3 和 HER4 可能不是这样。

EGFR-蛋白质的增加的水平也在膀胱癌中被发现并且过表达涉及肿瘤阶段和恶性肿瘤分级(Harney, J. V. et al, J Urol, 146, 227-31. (1991); Messing, E. M. Cancer Res, 50, 2530-7. (1990); Neal, D. E. et al, Cancer, 65, 1619-25. (1990); Sauter, G. et al. Int J Cancer, 57, 508-14. (1994); Gardmark T, et al. British Journal of Urology (BJU), 95, 982-986, 2005)。

神经胶质瘤是常见的原代中枢神经系统肿瘤, 在其最恶性形式多形性成胶质细胞瘤(GBM)中, 在所有分析的肿瘤中至少半数中可检测到 EGFR 过表达(Boskovitz A, et al. Expert Opin Biol Ther 4: 1453-1471, 2004; Shinojima N, et al. Cancer Res 63: 6962-6970, 2003; Ekstrand AJ, et al. Cancer Res 51: 2164-2172, 1991; Rainov NG et al. Journal of Neuro-Oncology 35 13-28 (1997); Carlsson J et al. J Neurooncol. 2005 Sep 8; [Epub ahead of print])。过表达是由于基因扩增和/或增加的转录速率, 并且已报道每个肿瘤细胞有 10^6 受体 (Rich JN, Bigner DD: Nat Rev Drug Discov 3: 430-446, 2004; Bigner SH et al. J Neuropathol Exp Neurol 47, 191-205 (1998); Carpenter G. Ann Rev Biochem 56, 881-914 (1987); Collins VP. Cancer Biology 4, 27-32 (1993); Libermann TA et al. Nature 313, 144-147, (1985); Kleihues P, Ohgaki H. Neuro-oncol 1, 44-51, (1999); Kleihues P, Ohgaki H. Toxicol Pathol 28, 164-170, (2000); Boskovitz A et al. Expert Opin Biol Ther 4, 1453-1471, (2004))。EGFR 过表达与增加的神经胶质瘤生长速率以及降低的存活有关 (Rich JN, Bigner DD: Nat Rev Drug Discov 3, 430-446, (2004); Carlsson J et al. J Neurooncol . 2005 Sep 8; [Epub ahead of print]; Schlegel J et al. Int J Cancer 56, 72-77, (1994); Wikstrand CJ, Bigner DD. J Natl Cancer Inst 90, 799-801, (1998); Shinojima N et al. Cancer Res 63, 6962-6970, (2003))并且已指出在肿瘤细胞浸润边缘 EGFR 过表达最明显(Okada Y, et al. Cancer Res 63, 413-416, (2003))。EGFR 特异性结合多肽可潜在地被用于神经胶质瘤治疗的治疗应用, 例如, 通过局部区域给予进入术后空腔。

上皮来源的其他几种恶性肿瘤, 例如在肺和胸中发现的那些, 也与 EGFR 高表达相关(Salomon, D. S. et al. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 19(3):

183-232, (1995))。EGFR 受体也分布在不同的正常组织中并且特别是在肝脏的肝细胞和皮肤上皮中表达至相当高的水平(Gusterson, B. et al. Cell Biol Int Rep, 8, 649-58. (1984); Damjanov, I. et al. Lab Invest, 55, 588-92. (1986))。这在治疗应用中可潜在地产生问题,特别是在放射性治疗中,但是,在给予少量的结合 EGFR 受体的诊断或成像标记物的诊断和成像应用中可能不是很重要。然而,在考虑局部用药的某些癌症中可发现 EGFR-结合多肽的应用。

本发明的目的是提供新的 EGFR-结合物质,其可被用于诊断、体外或体内成像,也可用于治疗应用。另外,这种 EGFR-结合多肽可用于分期(staging)和直接评价目的为下调靶受体的基于 SME 治疗。

除了标记的分子成像物质的发展之外,应用还包括在药物发展和筛选程序中的使用,其中期望特异性成像物质测量体内模型和随后的临床发展阶段的治疗结果。分子成像提供用于下调生长因子受体的药效的直接读数,也用于评估抗肿瘤效果。

发明简述

依据一个方面,本发明提供表皮生长因子受体(EGFR)结合多肽,其包含表皮生长因子受体结合基序 EBM,基序由选自如下的氨基酸序列组成:

i) EX₂X₃X₄AX₆X₇EIX₁₀ X₁₁LPNLNX₁₇X₁₈QX₂₀ X₂₁AFIX₂₅SLX₂₈D,

其中彼此独立地,

X₂ 选自 M、F、V、L、I 和 S;

X₃ 选自 W、D、E 和 L;

X₄ 选自 I、V、G、S、M、L、A、T、N、D 和 W;

X₆ 选自 W、V、L、I、M 和 S;

X₇ 选自 D、E、N 和 K;

X₁₀ 选自 R、G、H 和 K;

X₁₁ 选自 D、N、E、Y 和 S;

X₁₇ 选自 G、W 和 A;

X₁₈ 选自 W、G 和 A;

X₂₀ 选自 M、L、F、A 和 E;

X₂₁ 选自 T、D、N、A 和 Q;

X₂₅ 选自 A、S、N、G 和 L; 以及

X_{28} 选自 L、W、V、F 和 A；

以及

ii) 一个氨基酸序列，其与 i) 中定义序列至少具有 85% 相同性；

EGFR-结合多肽与 EGFR 结合，因此相互作用的 K_D 值至多是 $10\mu\text{M}$ 。

本发明 EGFR-结合多肽的一类相关序列的上述定义是基于在几个不同的选择实验中通过与 EGFR 的相互作用来进行选择的大量亲代支架随机多肽变体的统计学分析。可鉴别的 EGFR-结合基序或“EBM”相应于亲代支架的靶结合区域，该区域组成 3-螺旋束蛋白质结构域内的 2 个 α 螺旋。在亲代支架中，2 个 EBM 螺旋的不同氨基酸残基组成与抗体的恒定 Fc 部分相互作用的结合表面。在本发明中，结合表面残基的随机变化以及随后的变体选择以与 EGFR 相互作用的能力取代了 Fc 相互作用能力。

正如本领域技术人员将认识到的，任何多肽的功能例如本发明多肽的 EGFR-结合能力依赖于多肽的三级结构。因此可能多肽氨基酸序列的微小改变不会影响其功能。因此，本发明包含 i) 中修饰的 EBM 变体，以至产生的序列与属于 i) 所定义的一类序列是至少 85% 相同的。例如，属于某个氨基酸残基官能团的一个氨基酸残基（如疏水的、亲水的、极性的等）有可能交换为来自同一个官能团的另一个氨基酸残基。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_2 是 M。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_3 是 W。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_4 选自 I、V、G 和 S。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_6 选自 V 和 W。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{10} 选自 R 和 G。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{11} 选自 D、N 和 E。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{17} 选自 W 和 G。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{18} 选自 W 和 G，并且特别可能是 W。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{20} 是 M。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{21} 选自 T 和 D，并且特别可能是 T。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{25} 选自 A、S 和 N。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{28} 选自 L 和 W。

在本发明多肽的一个实施方案中， X_{18} 是 W 和 X_{21} 是 T。

在本发明多肽的一个实施方案中, X_{18} 是 W 和 X_{20} 是 M。

在本发明多肽亚类的一个更特异性的定义中, i) 的氨基酸序列至少满足 6 个、至少满足 7 个、至少满足 8 个或所有 9 个如下 9 个条件: X_2 是 M; X_3 是 W; X_6 是 W; X_{10} 是 R; X_{17} 是 G; X_{18} 是 W; X_{20} 是 M; X_{21} 是 T; X_{28} 是 L。

在所有 9 个条件都满足的情况中, i) 的序列是

EMWX₄AWX₇EIR X₁₁LPNLNGWQM TAFIX₂₅SLLD。

在本发明多肽亚类的另一个特异性定义中, i) 的氨基酸序列至少满足 3 个、至少满足 4 个或所有 5 个如下 5 个条件: X_{17} 是 G; X_{18} 是 W; X_{20} 是 M; X_{21} 是 T; X_{25} 是 A。

在所有 5 个条件都满足的情况中, i) 的序列是

EX₂X₃X₄AX₆X₇EIX₁₀ X₁₁LPNLNGWQM TAFIASLX₂₈D。

在另一个亚类中, i) 的序列是 EX₂X₃X₄AX₆X₇EIG X₁₁LPNLNWGQX₂₀ X₂₁AFIX₂₅SLWD, 例如 EX₂X₃IAVX₇EIG ELPNLNWGQX₂₀ DAFINSLWD。

如随后的实验部分所详述, 选择 EGFR-结合变体已经鉴定了大量各个 EGFR-结合基序 (EBM) 序列。在本发明这方面的 EGFR-结合多肽定义中, 这些序列组成 EBM 序列 i) 的各个实施方案。各个 EGFR-结合基序的序列在图 1 中显示并且标识为 SEQ ID NO: 1-163。在本发明这方面的实施方案中, EBM 序列 i) 可特别地选自 SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88 和 SEQ ID NO:147。

在本发明的实施方案中, EBM 可形成 3-螺旋束蛋白质结构域的一部分。例如, EBM 基本上组成或形成部分在所述 3-螺旋束蛋白质结构域内带有互接环 (interconnecting loop) 的 2 个 α 螺旋。

在本发明的特定实施方案中, 这样的 3-螺旋束蛋白质结构域选自细菌受体蛋白质的结构域。这种结构域的非限制性例子是 5 个不同的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的蛋白质 A 的 3-螺旋结构域及其衍生物。因此, 本发明的 EGFR-结合多肽可包含选自以下的氨基酸序列:

ADNNFNK-[EBM]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK (EBM 在葡萄球菌蛋白质 A 的结构域 A 内);

ADNKFNK-[EBM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (EBM 在葡萄球菌蛋白质 A 的结构域 B 内);

ADNKFNK-[EBM]-DPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK (EBM 在葡萄球菌

菌蛋白质 A 的结构域 C 内);

ADAQQNNFNK-[EBM]-DPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK (EBM 在葡萄球菌蛋白质 A 的结构域 D 内);

AQHDE-[EBM]-DPSQSANVLGEAQKLND SQAPK (EBM 在葡萄球菌蛋白质 A 的结构域 E 内); 和

VDNKFNK-[EBM]-DPSQSANLLAEAKKLND AQAPK (EBM 在葡萄球菌蛋白质 A 的结构域 B 的蛋白质 Z 衍生物中);

其中[EBM]是如上定义的 EGFR-结合基序。

本发明另一方面提供了 EGFR-结合多肽, 其包含衍生自氨基酸序列 SEQ ID NO:327: VDNKFNK EQQNAFY EILH LPNLNE EQRNAFIQSLKD DPSQ SANLLAEAKKLND A QAPK 的氨基酸序列, 所述衍生的氨基酸序列通过在以上序列的 9 到 11、13 到 14、17 到 18、24 到 25、27 到 28、32 到 35 位的任一或所有位置或与这些位置相应的位置的氨基酸取代而衍生, 与包含未修饰氨基酸序列的多肽比较, 所述取代可改良多肽与 EGFR 的结合, 并且其中 EGFR-结合多肽与 EGFR-结合, 由此相互作用的 K_D 值至多是 10 μ M。

另一方面, 本发明提供了 EGFR-结合多肽, 其氨基酸序列包含满足选自如下一个定义的序列: iii)其选自 SEQ ID NO: 164-326, 及 iv)其是与选自 SEQ ID NO: 164-326 的一个序列具有 85%或更高的相同性的氨基酸序列。在本发明这个方面的实施方案中, EGFR-结合多肽特别地可包含选自 SEQ ID NO:196、SEQ ID NO:211、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO: 251、SEQ ID NO:310 的序列和与其具有 85%或更高的相同性的序列。

本发明任何方面的 EGFR-结合多肽可结合 EGFR, 以致相互作用的 K_D 值至多是 1×10^{-6} M, 例如至多是 1×10^{-7} M。

当本文参考不同多肽的氨基酸序列之间的相同性程度时, 在此给出了与本文揭示的序列 85%相同性的下限。在一些实施方案中, 本发明的多肽可具有与本文描述的序列是至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%相同的序列。通过相应于被比较的最短序列窗口 (window), 或通过相应于至少一个被比较序列内的 EGFR-结合基序的窗口, 可完成比较。

多肽具有的优点是其与 EGFR 很好地结合。典型地，多肽可以相当的短并且由于它们小，在肿瘤组织中它们比抗体具有更好的渗透性，同时比常规低分子量 EGFR-结合物质（通常其半衰期太短）和单克隆抗体（通常循环时间太长）具有更好的体循环特性。

本发明多肽在长度上可大约有 53-58 个氨基酸。但是，长度可以更长或更短。例如，多肽的长度可在 N 末端最多减少 4 个氨基酸。

术语“位置”的使用是相对的。在长度与上述未修饰多肽相同为 53 个氨基酸的本发明多肽中，如果例如 N 末端延伸与未修饰多肽相比时，修饰多肽中相应于未修饰多肽中的那些氨基酸残基具有相同的位置数，则本发明多肽中氨基酸的位置与未修饰多肽中的那些精确对应。例如，若在修饰的多肽上存在 6 氨基酸残基延伸，则从 N 末端计算的修饰多肽的氨基酸数 7 相应于未修饰多肽的第 1 位的氨基酸。

因此，在不同医学、兽医、诊断和成像应用中，本发明的多肽可用作常规抗体或低分子量物质的另一个可选择方法。例如，本发明的 EGFR-结合多肽可用于治疗 EGFR 相关癌症如上述 EGFR 过表达导致的那些，特别当应用于局部分布时，例如神经胶质瘤。本发明的 EGFR-结合多肽也可用于通过结合细胞表面的 EGFR 而抑制细胞信号传导，用于癌症诊断，在体内和体外用作表达 EGFR 细胞特别是过表达 EGFR 的细胞的靶向物质，用于检测 EGFR 的组化方法，用于分离方法和其他应用。除了用于临床的分子成像物质的发展之外，也可用于测量体内模型中的治疗结果的特异性临床前成像物质以及随后的临床开发中。分子成像应提供下调生长因子受体例如 HER2 或 EGFR 的药物效力的直接读数，也可以评估抗肿瘤作用。在依赖于试剂与 EGFR 亲和力的任何方法中，本发明的多肽都是有用的。因此，在这种方法中，多肽可被用作检测试剂，捕获试剂或分离试剂，但是凭借它们自身情况，也可用作治疗药物或用作靶向其他治疗药物的手段，对于 EGFR 蛋白质具有直接（例如，毒性分子，毒素）或间接治疗作用（例如，癌症疫苗，免疫刺激分子）。

以不同形式进行体外使用本发明多肽的方法，例如微孔板，在蛋白质阵列上，在生物传感器表面，在珠上，在流式细胞仪中，在组织切片上等等。

本领域技术人员将意识到可以对本发明多肽进行不同的修饰和/或添加

以便裁剪多肽适于不偏离本发明范围的特异应用。以下更详细的描述了这些修饰和添加，其可以包括在同一多肽链中的额外的氨基酸，或与本发明多肽化学缀合或结合的标记和/或治疗药物。

此外，本发明也包含保留 EGFR-结合的衍生自蛋白质 A 的 EGFR-结合多肽的片段。Braisted AC et al 在 Proc Natl Acad Sci USA 93:5688-5692 (1996) 中示出了产生具有保留的结合特异性的野生型 SPA 结构域片段的可能性。在该文章描述的实验中，使用基于结构的设计和噬菌体展示方法，59 个残基的 3-螺旋束的结合结构域被减少为所得的 33 个残基的 2-螺旋衍生物。这通过逐步选择不同区域的随机突变来实现，其导致稳定性和结合亲和力被重复改良。同样道理，使用本发明的多肽，本领域技术人员将能够获得“最小的”EGFR-结合多肽，其具有与“亲代”EGFR-结合多肽同样的结合特性。因此，组成本发明多肽的片段的多肽在本发明的范围内。

在本说明书中使用的术语“EGFR-结合”和“EGFR 的结合亲和力”指例如在 Biacore 仪器上通过使用表面等离子共振技术检测的多肽特性。例如如下实例所述，在 EGFR-结合亲和力可在实验中测试，所述实验中 EGFR 或 EGFR 片段例如其细胞外结构域被固定在仪器的传感器芯片上，含有待测多肽的样品经过所述芯片。或者，待测多肽被固定在仪器的传感器芯片上，并且含有 EGFR 或 EGFR 片段例如其细胞外结构域的样品经过所述芯片。在这点上，EGFR 可以是包含氨基酸序列 SEQ ID NO:328 的多肽，并且其细胞外结构域可以是包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 329 的多肽。然后，本领域技术人员可解释通过这个实验获得的结果以确定至少一个多肽与 EGFR 的结合亲和力的定性测量方法。如果需要定性测量方法，例如需确定相互作用的 K_D 值，也可以使用表面等离子共振方法。例如通过 Biacore 2000 仪器(Biacore AB)可定义结合值。EGFR 被固定在仪器的传感器芯片上，待测亲和力的多肽样品通过系列稀释制备并以随机顺序注射。然后，例如使用由仪器厂商(Biacore AB)提供的 BIAevaluation 4.1 软件的 1:1 Langmuir 结合模型从结果计算 K_D 值。

在导入氨基酸取代的位置，这些将不会影响多肽的基本结构。例如，多肽的 $C\alpha$ 主链的整体折叠与相关的 Z“野生型”结构域基本上相同，即具有同样顺序的相同二级结构元件。因此，具有这个基本结构的多肽将具有与 Z“野生型”结构域相似的 CD 光谱。本领域技术人员意识到相关的其他参数。

保存基本结构的要求对可以进行取代的氨基酸序列的位置产生了限制。例如,优选取代位于多肽表面的氨基酸残基,但是掩藏在多肽“3-螺旋束”核心内的氨基酸残基应保持恒定以便于保持分子的结构特性。同样道理应用于本发明的多肽片段。

本发明也涵盖了这样的多肽,其中如上所述的 EGFR-结合多肽呈现为在任一末端添加了额外氨基酸残基的 EGFR-结合结构域。这些额外氨基酸残基在多肽结合 EGFR 中发挥作用,但是也同样用于其他目的,例如涉及多肽的生产、纯化、稳定性、偶联或检测的一或多个。这种额外氨基酸残基可包含加入用于化学偶联目的的一或多个氨基酸残基。这样的实例是在多肽链非常前面或非常后面的位置即在 N 或 C 末端附加半胱氨酸残基。这种额外氨基酸残基也提供用于多肽纯化或检测的“标记”,如与特异于标记的抗体相互作用的 His₆ 标记或者"myc"标记或者"flag"标记。

本发明也涵盖了这样的 EGFR-结合多肽,其中如上所述的 EGFR-结合多肽呈现为如下的 EGFR-结合结构域,其中额外的肽或蛋白质或其他官能团与其 N-或 C-末端偶联或通过化学缀合(使用已知有机化学方法)与任何其他残基(特异性或非特异性)偶联。

以上讨论的“额外的氨基酸残基”也可以提供一或多个具有任何所需功能的多肽结构域,例如与最初 EGFR-结合结构域同样的结合功能,或另一种结合功能,或酶功能,毒性功能(例如免疫毒素),或荧光信号传导功能,或其组合。

本发明的多肽可以是单体或多聚体形式。多肽的多聚体形式具有优势,因为它们可具有增强的结合特性。优选的多聚体形式包括二聚体和三聚体形式。多肽的多聚体形式可包含适当数目的本发明多肽。本质上,这些多肽在多聚体内形成结构域。这些结构域都具有相同的氨基酸序列,但是或者它们可以具有不同的氨基酸序列。使用已知的有机化学方法通过共价偶联连接多肽,或在多肽的重组表达系统中表达为一个或多个融合多肽,或直接或通过接头例如氨基酸接头以任何其他方式连接。

另外,其中本发明的 EGFR-结合多肽提供第一个结构域或部分并且第二个或其他部分具有结合 EGFR 以外其他功能的融合多肽也被预期并在本发明的范围内。这种融合多肽的第二个或其他部分可包含对 EGFR 之外的另一个靶分子具有亲和力的结合结构域。这种结合结构域可以是另一个相

似的多肽结合物 (binder)。例如, 多肽结合物可以是 Z 变体。这可能产生多特异性试剂, 其可用于一些类型的应用例如医学、兽医学、诊断、分离和成像。通常, 通常如上所述可进行这种多特异性融合多肽的制备。

在本发明的另一个实施方案中, 第二个或其他部分可包含不相关的天然产生或重组的对靶具有结合亲和力的蛋白质 (或其保留了结合或天然产生或重组蛋白质的其他能力的片段)。例如, 本发明的 EGFR-结合多肽可被连接到链球菌蛋白质 G 的白蛋白结合结构域上或任何其他对血清蛋白质有亲和力的蛋白质/多肽上以改良用于治疗应用的 EGFR-结合多肽的半衰期。

本发明的 EGFR-结合多肽可以其他融合多肽的形式提供。例如, EGFR-结合多肽或其片段可被共价偶联到第二个或另一个或另几个部分, 除了靶结合或代替靶结合, 其呈现其他功能。一个实例是一个或多个 EGFR-结合多肽和用作报道基因或效应部分的具有酶活性的多肽之间的融合物。可被偶联到 EGFR-结合多肽以形成融合蛋白质的报道酶的例子是本领域技术人员熟知的, 包括的酶如 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、羧肽酶。本发明融合多肽的第二个和其他部分的其它选择包括荧光多肽, 例如绿色荧光蛋白质, 红色荧光蛋白质, 荧光素酶和其变体。

本发明融合多肽的第二个和其他部分的其它选择包括用于治疗应用的一个部分或多个部分。在治疗应用中, 通过其他方法, 其他分子也可被共价或非共价偶联到本发明的 EGFR-结合多肽上。例如, 其他分子如用于“ADEPT”(抗体导向酶-前体药物疗法) 应用的酶, 其使用本发明的多肽导向效应酶 (例如羧肽酶) 或 RNase 或 DNase 融合; 募集效应细胞和其他免疫系统组分的蛋白质; 细胞因子, 如 IL-2、IL-12、TNF α 、IP-10; 促凝血因子, 如组织因子、von Willebrand 因子; 毒素, 如蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素、calceamicin、maytansinoid, 毒素小分子, 如 auristatin 类似物、阿霉素。

以上描述的额外的氨基酸 (特别是六组氨酸、半胱氨酸) 可用于偶联放射性同位素螯合剂于 EGFR-结合多肽以容易地掺入放射性核素用于诊断 (例如 ^{68}Ga , ^{76}Br , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{125}I) 或治疗 (例如 ^{90}Y , ^{131}I , ^{211}At , ^{177}Lu)。

本发明也包含多肽, 其中如上所述的 EGFR-结合多肽已具有标记基团例如至少一个荧光团、生物素或放射性同位素例如用于检测多肽的目的。

关于如上所述的融合多肽和掺入本发明 EGFR-结合多肽的蛋白质, 需

要注意的是第一个、第二个和其他部分的命名一方面是为区别 EGFR-结合部分，另一方面是区别呈现其他功能的部分。这些命名不是指融合蛋白或多肽的多肽链内不同结构域的实际顺序。因此，例如，第一个部分可出现在融合蛋白或者多肽的 N 末端，中间，或 C 末端。

根据如下的实施方案和所附的权利要求书，本发明其他优选方面和实施方案将会清楚。

所有本发明提及的科学文章和专利文件均并入本文参考。

本发明的实施方案

1. 一个 EGFR-结合多肽，其包含衍生自如下氨基酸序列的氨基酸序列：VDNKFNK EQQNAFYEILH LPNLNE EQRNAFIQSLKD DPSQ SANLLAEAKKLNDA QAPK，所述衍生的氨基酸序列通过在如上序列的 9 到 11、13 到 14、17 到 18、24 到 25、27 到 28、32 和 35 位的任一或所有位置或这些位置的相应位置包含氨基酸取代而衍生，与包含未修饰氨基酸序列的多肽比较，所述取代改良了多肽与 EGFR 的结合，其中 EGFR-结合多肽与 EGFR 结合，因此相互作用的 K_D 值至多是 $10\mu\text{M}$ 。

2. 实施方案 1 的 EGFR-结合多肽，其中第 9 位的氨基酸取代是疏水性氨基酸。

3. 实施方案 1 或 2 的 EGFR-结合多肽，其中第 9 位的氨基酸取代是非极性氨基酸。

4. 实施方案 1 到 3 任一项的 EGFR-结合多肽，其中第 9 位的氨基酸取代具有脂肪族 R 基团。

5. 实施方案 1 到 4 任一项的 EGFR-结合多肽，其中第 9 位的氨基酸取代具有芳香族 R 基团。

6. 实施方案 1 到 2 或 4 或 5 任一项的 EGFR-结合多肽，其中第 9 位的氨基酸取代是极性氨基酸。

7. 实施方案 1 到 5 任一项的 EGFR-结合多肽，其中第 9 位的氨基酸取代是不带电荷的。

8. 实施方案 1 到 7 任一项的 EGFR-结合多肽，其中第 9 位的氨基酸取代是碱性氨基酸。

9. 实施方案 1 到 8 任一项的 EGFR-结合多肽，其中第 9 位的氨基酸取代选自 W、M、T、F、H、S、L、A 和 V。

10.实施方案 3 的 EGFR-结合多肽, 其中第 9 位的氨基酸取代是 M、F、L 或 V。

11.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 10 位的氨基酸取代是疏水性氨基酸。

12.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 10 位的氨基酸取代是亲水性氨基酸。

13.实施方案 1 到 11 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 10 位的氨基酸取代是中性的。

14.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 10 位的氨基酸取代是极性氨基酸。

15.实施方案 1 到 13 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 10 位的氨基酸取代是非极性氨基酸。

16.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 10 位的氨基酸取代是酸性氨基酸。

17.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 10 位的氨基酸取代是选自 S、L、G、Y、A、E、W 和 Q。

18.实施方案 17 的 EGFR-结合多肽, 其中第 10 位的氨基酸取代是 L、Y、E 或 Q。

19.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代是疏水性的。

20.实施方案 1 到 18 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代是中性的。

21.实施方案 1 到 19 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代是亲水性的。

22.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代是非极性氨基酸。

23.实施方案 22 的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代具有脂肪族 R 基团。

24.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代具有正电荷 R 基团。

25.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代是

碱性氨基酸。

26.实施方案 1 到 21 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸是极性氨基酸。

27.实施方案 1 到 23 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸是不带电荷的。

28.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代选自 A、I、K、P 和 N。

29.实施方案 28 的 EGFR-结合多肽, 其中第 11 位的氨基酸取代是 A、I 或 K。

30.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 13 位的氨基酸取代是疏水性的。

31.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 13 位的氨基酸取代是非极性的。

32.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 13 位的氨基酸取代具有脂肪族 R 基团。

33.实施方案 1 到 30 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 13 位的氨基酸取代是有极性的。

34.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 13 位的氨基酸取代是不带电荷的。

35.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 13 位的氨基酸取代具有芳香族 R 基团。

36.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 13 位的氨基酸取代选自 A、S、V、M、I、Y、W 和 T。

37.实施方案 8 的 EGFR-结合多肽, 其中第 13 位的氨基酸取代是 M、I、Y 或 V。

38.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸是亲水性的。

39.实施方案 1 到 37 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代是中性的。

40.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代是极性的。

41.实施方案 40 的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代是不带电荷的。

42.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代是酸性的。

43.实施方案 1 到 41 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代是碱性的。

44.实施方案 1 到 39 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代是非极性的。

45.实施方案 44 的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代具有脂肪族 R 基团。

46.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代具有负电荷 R 基团。

47.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代选自 S、E、R、T、W、V、N、T 和 A。

48.实施方案 47 的 EGFR-结合多肽, 其中第 14 位的氨基酸取代是 S 或 T。

49.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 17 位的氨基酸取代是中性的。

50.实施方案 1 到 48 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 17 位的氨基酸取代是亲水性的。

51.实施方案 1 到 48 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 17 位的氨基酸取代是疏水性的。

52.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 17 位的氨基酸取代是极性的。

53.实施方案 52 的 EGFR-结合多肽, 其中第 17 位的氨基酸取代是不带电荷的。

54.实施方案 1 到 52 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 17 位的氨基酸是带正电荷的。

55.实施方案 1 到 51 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 17 位的氨基酸取代是非极性的。

56.实施方案 55 的 EGFR-结合多肽, 其中第 17 位的氨基酸带有脂肪族

R 基团。

57.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 17 位的氨基酸是碱性的。

58.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 17 位的氨基酸取代选自 S、G、N 和 V。

59.实施方案 12 的 EGFR-结合多肽,其中第 17 位的氨基酸取代选自 G、N 和 V。

60.实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸是中性的。

61.实施方案 1 到 59 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代是亲水性的。

62.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代是非极性的。

63.实施方案 1 到 61 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代是极性的。

64.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代是不带电荷的。

65.实施方案 1 到 63 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代是带正电荷的。

66.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代是酸性的。

67.实施方案 1 到 65 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代是碱性的。

68.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代选自 G、S、D、R、N、H、E 和 K。

69.实施方案 68 的 EGFR-结合多肽,其中第 18 位的氨基酸取代是 R 或 N。

70.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代是疏水性的。

71.实施方案 1 到 69 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代是中性的。

72.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代是

碱性的。

73.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代是非极性的。

74.实施方案 73 的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代具有脂肪族 R 基团。

75.实施方案 1 到 72 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代是极性的。

76.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代具有芳香族 R 基团。

77.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代选自 K、W、N、G、L、R 和 M。

78.实施方案 77 的 EGFR-结合多肽,其中第 24 位的氨基酸取代是 V 或 G。

79.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 25 位的氨基酸取代是中性的。

80.实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 25 位的氨基酸取代是疏水性的。

81.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 25 位的氨基酸取代是非极性的。

82.实施方案 81 的 EGFR-结合多肽,其中第 25 位的氨基酸取代具有脂肪族 R 基团。

83.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 35 位的氨基酸取代具有芳香族 R 基团。

84.实施方案 1 到 80 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 25 位的氨基酸是极性的。

85.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 25 位的氨基酸取代是碱性的。

86.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 25 位的氨基酸取代选自 L、G、W、V、S、H 和 W。

87.实施方案 86 的 EGFR-结合多肽,其中第 25 位的氨基酸取代是 G 或 W。

88.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是亲水性的。

89.实施方案 1 到 88 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是疏水性的。

90.实施方案 1 到 88 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是中性的。

91.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是非极性的。

92.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是酸性的。

93.实施方案 1 到 90 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是极性的。

94.实施方案 93 的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是不带电荷的。

95.实施方案 1 到 91 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是碱性的。

96.实施方案 1 到 93 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代具有负电荷 R 基团。

97.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代选自 A、E、F、M、L、C、K、G 和 S。

98.实施方案 97 的 EGFR-结合多肽,其中第 27 位的氨基酸取代是 E、M 或 S。

99.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 28 位的氨基酸取代是中性的。

100.实施方案 1 到 98 任一项的 EGFR-结合多肽,其中第 28 位的氨基酸取代是疏水性的。

101.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 28 位的氨基酸取代是非极性的。

102.实施方案 101 的 EGFR-结合多肽,其中第 28 位的氨基酸取代具有脂肪族 R 基团。

103.实施方案的 EGFR-结合多肽,其中第 28 位的氨基酸取代是极性的。

104.实施方案 103 的 EGFR-结合多肽, 其中第 28 位的氨基酸取代是不带电荷的。

105.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 28 位的氨基酸取代是碱性的。

106.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 28 位的氨基酸取代选自 F、Q、V、A、K、V 和 T。

107.实施方案 106 的 EGFR-结合多肽, 其中第 28 位的氨基酸取代是 T、Q 或 V。

108.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸取代是疏水性的。

109.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸取代是中性的。

110.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸取代是非极性的。

111.实施方案 110 的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸具有脂肪族 R 基团。

112.实施方案 1 到 109 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸取代是极性的。

113.实施方案 112 的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸取代是不带电荷的。

114.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸取代是碱性的。

115.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸取代选自 V、L、S、F、A 和 R。

116.实施方案 115 的 EGFR-结合多肽, 其中第 32 位的氨基酸取代是 L、S 或 A。

117.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代是疏水性的。

118.实施方案 1 到 116 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代是中性的。

119.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代

是非极性的。

120.实施方案 119 的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代具有脂肪族 R 基团。

121.实施方案 1 到 118 任一项的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代是极性的。

122.实施方案 121 的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代是不带电荷的。

123.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代是碱性的。

124.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代具有芳香族 R 基团。

125.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代选自 V、W、S、R、M、H 和 L。

126.实施方案 125 的 EGFR-结合多肽, 其中第 35 位的氨基酸取代是 W、S 或 V。

127.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中位于多肽表面上的氨基酸残基被取代。

128.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其中在多肽三维结构核心内的氨基酸残基不被取代。

129.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽, 其通过 C 末端和/或 N 末端氨基酸延伸而被延长。

130.实施方案 129 的 EGFR-结合多肽, 其中所述或每个氨基酸延伸增强了多肽与 EGFR 的结合。

131.实施方案 129 或 130 的 EGFR-结合多肽, 其中所述或每个氨基酸延伸改良了多肽的生成、纯化、体内或体外稳定性、偶联或检测。

132.实施方案 131 的 EGFR-结合多肽, 其中所述或每个氨基酸延伸包括在多肽氨基酸序列开始或最后位置上的半胱氨酸残基。

133.实施方案 131 的 EGFR-结合多肽, 其中氨基酸残基延伸包含 His₆ 标记或"myc"或"flag"标记。

134.实施方案 131 的 EGFR-结合多肽, 其中所述延伸包含链球菌蛋白质 G 的白蛋白-结合结构域或其衍生物, 其改良了治疗应用中 EGFR-结合多肽

的半衰期。

135.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其包含大约 53 个氨基酸。

136.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其结合 EGFR,因此相互作用的 K_D 值至多是 1×10^{-6} M。

137.实施方案 136 的 EGFR-结合多肽,其结合 EGFR,因此相互作用的 K_D 值至多是 1×10^{-7} M。

138.任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其结合 EGFR 胞外结构域。

139.实施方案 138 的 EGFR-结合多肽,其结合相应于成熟 EGFR (SEQ ID NO:328)的核苷酸 259-2127 的 EGFR 胞外结构域(SEQ ID NO: 329)部分。

140.EGFR-结合多肽,其包含任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽的片段。

141.实施方案 140 的 EGFR-结合多肽,其中所述片段包含实施方案 1 到 139 任一项的多肽的 N 末端减少。

142.实施方案 141 的 EGFR-结合多肽,其中所述 N 末端减少是最多 4 个氨基酸。

143.多聚体形式的任何前述实施方案的 EGFR-结合多肽,其包含 EGFR-结合多肽单元。

144.实施方案 143 的 EGFR-结合多肽,其中 EGFR-结合多肽单体单元共价偶联在一起。

145.实施方案 143 的 EGFR-结合多肽,其中 EGFR-结合多肽单体单元表达为融合蛋白。

146.二聚体形式的实施方案 143 到 145 任一项的 EGFR-结合多肽。

147.编码任何前述实施方案的多肽的核苷酸。

148.生产实施方案 1 到 146 任一项的多肽的方法,该方法包含表达实施方案 147 的核苷酸。

149.实施方案 1 到 146 任一项的 EGFR-结合多肽与可检测物质的组合。

150.实施方案 149 的组合,其中可检测物质是用于放射成像的放射性物质。

151.实施方案 150 的组合,其中放射性物质是放射性核素。

152.实施方案 149 的组合,其中可检测物质是酶。

153.实施方案 152 的组合,其中酶选自 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、辣

根过氧化物酶和羧肽酶。

154.实施方案 149 的组合,其中可检测物质是荧光多肽。

155.实施方案 1 到 146 任一项的 EGFR-结合多肽与治疗药物的组合。

156.实施方案 149 到 155 任一项的组合,其中 EGFR-结合多肽和可检测物质或治疗药物共价连接在一起。

157.实施方案 149 到 155 任一项的组合,其中 EGFR-结合多肽和可检测物质或治疗药物表达为融合蛋白。

158.一种放射成像的方法,其中实施方案 150 到 151 任一项的组合被用作一个放射成像物质。

159.一种检测 EGFR 的方法,包含提供怀疑含有 EGFR 的样品,将样品与实施方案 1 到 146 任一项的 EGFR-结合多肽或实施方案 149 到 154 任一项的组合相接触,并检测多肽或组合的结合或样品以指示样品中 EGFR 的存在。

160.实施方案 159 的检测方法,其中超过一个的 EGFR 被检测。

161.一种从样品分离或捕获 EGFR 的方法,该方法包含将样品与实施方案 1 到 146 任一项的 EGFR-结合多肽或实施方案 149 到 154 任一项的组合相接触,因此 EGFR 结合多肽并从样品中去除。

162.一种用于确定个体内 EGFR 存在的诊断方法,该方法包括将个体或来自于个体的样品与实施方案 1 到 146 任一项的 EGFR-结合多肽或实施方案 149 到 154 任一项的组合相接触,并检测多肽或组合的结合。

163.实施方案 162 的方法,其中个体是人或动物。

164.实施方案 162 的方法,其中所述方法在体内进行。

165.实施方案 162 或 163 的方法,其中所述方法在体外样品上进行。

166.一种治疗个体或衍生自个体的材料内 EGFR-相关病症的方法,其中所述个体或材料用实施方案 1 到 146 任一项的 EGFR-结合多肽或实施方案 155 到 157 任一项的组合处理。

167.实施方案 166 的治疗方法,其中实施方案 1 到 146 任一项的 EGFR-结合多肽或实施方案 155 到 157 任一项的组合与个体或材料内的 EGFR 的结合抑制或刺激受体激活。

168.实施方案 166 或 167 的治疗方法,其中所述 EGFR-结合多肽与个体或材料内的 EGFR 的结合抑制细胞信号传导。

169.实施方案 166 到 168 任一项的治疗方法,其中 EGFR-相关病症是癌症。

170.实施方案 169 的治疗方法,其中癌症选自肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、头颈癌。

171.实施方案 166 到 170 任一项的方法,其中个体是人或动物。

附图简述

本发明多肽及其应用方法通过参考附图 1-12 作为例子进行描述,其中:

图 1 是包含在本发明 EGFR-结合多肽内的 EGFR 结合基序实例(SEQ ID NO: 1-163)、本发明 EGFR-结合多肽实例(SEQ ID NO: 164-326)、金黄色葡萄球菌蛋白质 A 的结构域 B 的蛋白质 Z 衍生物实例(SEQ ID NO:327)、全部人类 EGFR(SEQ ID NO: 328)和人类 EGFR 胞外结构域(SEQ ID NO: 329)的氨基酸序列列表。

图 2A 显示本发明从实施例 1 选择的不同 EGFR-结合多肽氨基酸序列与蛋白质 Z 序列相比较。该图指示碱性、酸性、非极性和极性氨基酸残基;图 2B 显示图 2A 中 4 个多肽的氨基酸序列并指示疏水性、中性和亲水性氨基酸残基,图 2C 显示图 2B 的具有高亮的明显其他特征的多肽的氨基酸序列,图 2D 举例说明产生本发明多肽的亲合力成熟策略;

图 3 显示 SDS-PAGE 分析 EGFR-结合多肽 His₆-Z_{EGFR:942} (泳道 1)、His₆-Z_{EGFR: 948} (泳道 2)、His₆-Z_{EGFR: 955} (泳道 3)、His₆-(Z_{EGFR: 942})₂(泳道 4)、His₆-(Z_{EGFR:948})₂ (泳道 5)和 His₆-(Z_{EGFR:955})₂ (泳道 6) 的结果。泳道 M 含有蛋白质标准分子量。从右起,分子量以千道尔顿表示。

图 4 显示使用本发明的不同 EGFR-结合多肽进行的生物传感器结合研究的结果;

图 5 显示本发明 3 个 EGFR-结合多肽对于天然 EGFR 亲和力的流式细胞仪分析结果;

图 6 是暴露于本发明荧光标记的 EGFR-结合多肽的细胞的一系列共焦显微术图像;

图 7 是显示用本发明放射性标记的 EGFR-结合多肽的细胞结合研究的结果的图;

图 8 是一效力显示饱和度结果和用本发明放射性标记的 EGFR-结合多

肽研究结果的图;

图 9 显示使用依据本发明的不同 EGFR-结合多肽进行的生物传感器结合研究的结果;

图 10 是一系列细胞图像,细胞暴露于本发明 EGFR-结合多肽,使用 A)荧光检测和 B)酶促检测;

图 11 是显示在 A431 细胞上本发明 EGFR-结合多肽的铟-111 标记的苯甲基-DTPA 缀合物的体外特异性测试的结果的图。所有数据点是 3 次测量的平均值,误差线代表 SEM。

图 12 是一系列显示在携带 A431 移植物的小鼠内 ^{111}In -苯甲基-DTPA-EGFR 结合缀合物的生物分布以及肿瘤与正常组织比例的图。每个数据点代表 4 只动物 $\pm$ 标准差的平均数并表示为每克器官或组织注射的放射性百分率。

在以下实验中,使用噬菌体展示选择衍生自金黄色葡萄球菌蛋白质 A 的 B 结构域的蛋白质 Z 衍生物的 EGFR-结合变体。EGFR-结合 Z 变体有时共同表示为 Z_{EGFR} 。每个 Z 变体被给予一个唯一的鉴定号码#####,并且各个变体可互换表示为 Z##### 和 $Z_{\text{EGFR}}: \text{#####}$ 。

实施例 1

本发明 EGFR 结合多肽的第一轮选择

材料和方法

多肽结合物、菌株、载体和噬菌粒文库的制备

大肠杆菌菌株 RRIΔM15 (Ruther, U. (1982) *Nucleic Acids Res.*, 10, 5765-5772)的琥珀抑制基因被用作噬菌体生产和克隆程序的细菌宿主。Gronwall C, Jonsson A, Lindstrom S, Gunneriusson E, Stahl S, Heme N: "Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid beta peptides", *J. Biotechnol.* (2006)待发表, Epub 27 Sep 2006 中揭示了用于这个研究的嗜菌粒载体 pAffil 以及构建嗜菌粒文库 Zlib2002 (3×10^9 成员)。选择克隆的嗜菌粒插入物被亚克隆到表达载体 pAY442 和 pAY430 中,其含有 T7 启动子(Studier et al., (1990) *Methods Enzymol.*, 185, 60-89)、编码六组氨酸(His₆)标记和多克隆位点的 DNA 片段和卡那霉素抗性基因,以及用于直接标记 pAY430 的 C 末端额外的半胱氨酸。大肠杆菌菌株

BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI)用于从表达载体产生蛋白质。

制备噬菌体原液

从文库(Zlib2002 的一部分)制备噬菌体原液和选择使用辅助噬菌体 M13K07 (New England Biolabs, Beverly, MA)依据前述程序(Nord, K et al., (1997) Nat. Biotechnol., 15, 772-777; Hansson et al., (1999) Immunotechnology, 4, 237-252)进行。PEG/NaCl 沉淀产生的噬菌体滴度大约是 10^{13} pfu/ml。

噬菌体选择

包含 623 个氨基酸的、相应于核苷酸 259-2127 的 EGFR 的~100kDa 重组胞外结构域 (ECD) 在选择过程中用作靶蛋白质(SEQ ID NO:329)。使用 EZ-Link™-Sulfo-NHS-LC-生物素(Pierce, Rockford, IL)将蛋白质体外生物素化。在磷酸缓冲盐溶液(PBS; 10mM 磷酸盐, 137mM NaCl, pH7.2)中的 EGFR-ECD 内加入 20 倍摩尔过量的生物素, 并且混合物在室温保温 1 小时, 然后在 4℃对 PBS 广泛透析去除多余的生物素。

然后, 生物素化的靶蛋白质被固定在链霉抗生物素蛋白包被的顺磁珠上(Dynabeads M-280 Streptavidin; Dynal A. S., Oslo, Norway)。每一轮选择, 使用添加 0.1% Tween-20 (PBST)的 PBS 洗珠 2 次。为避免非特异性结合物, 在这个程序中使用的所有试管用添加 0.1%明胶的 PBST 预处理。为了进一步避免针对顺磁珠上存在的链霉抗生物素蛋白的结合物, 第 1 和第 2 轮使用 0.2mg 珠 (预先使用 PBST 洗 2 次) 与添加 0.1 %明胶的 PBST 中的噬菌体原液预保温。未结合的噬菌体原液在连续颠倒 (end-over-end) 旋转下在室温进行生物淘选 EGFR-ECD 靶蛋白 1 小时 45 分钟, 随后与链霉抗生物素蛋白包被的顺磁珠保温 15 分钟 (室温, 连续颠倒旋转)。如下进行 2 次分离选择, 在每轮淘选中使用 2 个不同的递减的靶蛋白浓度。第 1 轮; 12 和 1.2μg 靶蛋白与 6 和 0.6 mg 珠分别保温; 第 2 轮; 5、2.5、0.5 和 0.35μg 靶蛋白与 2.5、1.25、0.25、0.125mg 珠分别保温; 第 3 轮和第 4 轮; 5、1、0.5 和 0.1μg 靶蛋白与 1、0.5、0.1、0.05mg 珠分别保温。这个程序导致每 mg 珠固定~2μg 靶蛋白, 由 SDS-PAGE 分析来确定。按如下进行 4 轮生物淘选。在第 1 轮中使用 PBST 洗珠 2 次, 在第 2 轮中 5 次, 在第 3 轮中 7 次以及在第 4 轮中 10 次。随后, 使用 500μl 50mM 甘氨酸-HCl, pH 2.1 洗脱结合的噬菌体, 室温 10 分钟, 随后立即使用 50μl 1M Tris-HCl, pH 8.0 和 450μl PBS 中和。

洗脱的噬菌体用于感染对数生长期的 RRIΔM15 细胞, 37°C, 30 分钟。被感染的细胞悬液涂布在添加 2%葡萄糖和 100mg/l 氨苄青霉素的 TYE 琼脂板上(15g/l 琼脂, 8g/l NaCl, 10g/l 胰蛋白胨和 6g/l 酵母提取物), 随后 37°C 保温过夜。在补加了 5g/l 酵母提取物、2%葡萄糖和 100μg/ml 氨苄青霉素的胰蛋白酶大豆肉汤(TSB, 30g/l; Merck, Darmstadt, Germany)中重悬收集生长的菌落, 并将级分(与洗脱后噬菌体滴度比较~500 倍过量细胞)用于接种, 以生产下一代噬菌体原液。通过滴定选择前和洗脱后的噬菌体原液来监测选择过程。一系列噬菌体稀释液被允许感染对数生长期 RRIΔM15 细胞, 室温 5 分钟, 随后接种在添加 2%葡萄糖和 100μg/ml 氨苄青霉素的 TYE 琼脂板上, 37°C 保温过夜。

链霉抗生物素蛋白 ELISA

4 轮生物淘选之后, 在从全部 4 轮选择中随机挑选的 372 个菌落上进行 ELISA, 以排除具有链霉抗生物素蛋白结合能力的噬菌粒(pAffil)插入物。随机挑选菌落的细胞裂解物在预封闭(添加 2 %奶粉的 PBST)的链霉抗生物素蛋白包被的 96 孔板(Nunc transparent, c96, 236001)中保温, 室温 1.5 小时。使用一抗兔 IgG 泛抗多肽特异性结合物(1.5 小时, 室温, 连续摇动)和二抗兔免疫球蛋白-HRP (P0448 Daco Cytomatation; 1 小时, 室温, 连续摇动)。在加入底物溶液(Immunopure TMB; Pierce)后, 使用 Tecan Sunrise 分光光度计测量 A_{405nm} 吸光度。

DNA 测序

在第 4 轮淘选的非链霉抗生物素蛋白结合克隆上进行噬菌粒(pAffil)插入物的 DNA 测序, 其中 64 个克隆来自选择 1 和 2, 32 个来自选择 3 和 4。使用特异性引物和 Big Dye 终止物(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)和在 DNA 测序仪 ABI prism 3700 Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)上分析 Sanger 片段。同样的程序验证亚克隆 DNA 片段。

在排除具有琥珀终止密码子(3 个)、超过一个的半胱氨酸(1 个)以及在其他靶选择中已被发现的序列(3 个)后, 选择 10 个序列进行进一步的研究。这些多肽结合物各自的氨基酸序列显示在图 1 和在 SEQ ID NO: 164-173 中揭示。这些变体的推测的 EGFR 结合基序在 SEQ ID NO: 1-10 中显示。选择的变体的序列也在图 2A 中显示。特别地, 在图 2A 中, 相应于“野生型”Z 结构域的氨基酸序列与针对 EGFR-EDC 选择的 10 个不同多肽结

合物的推测的氨基酸序列进行排列对比，在图中以及在本说明书别处使用的破折号代表与“野生型”序列内相应氨基酸相同的氨基酸。显示 13 个随机化的氨基酸残基(Q9, Q10, N11, F13, Y14, L17, H18, E24, E25, R27, N28, Q32, K35)。在超过一种变体内相同位置出现的氨基酸残基以粗体表示。水平线指示氨基酸特性。右图显示每个多肽结合物在 372 个菌落的 DNA 测序中被检测到的次数。框内显示野生型 Z 结构域内的 3 个 α -螺旋。

图 2B 和图 2C 给出本发明多肽结合物内的氨基酸取代的更多的特性。在疏水性/亲水性上下文中，“中性”表示相对既不是疏水性也不是亲水性的氨基酸。

图 2D 图解说明改良最初确定的多肽结合物的成熟策略。就此而论，在第 9、10、11、13 和 14 位的残基可能不太重要并且被取代，而第 17 和 18 位，天冬酰胺和精氨酸是特别优选的，尽管由于技术原因也可能是优选的丝氨酸和组氨酸也可以被产生并作为密码子类似性的结果而用于结合。在第 35 位，优选缬氨酸和丝氨酸，尽管由于技术原因也可以特别选择亮氨酸和丙氨酸。第 24、25、27、28 和 32 位分别预期为氨基酸 G、W、M、T 和 A，虽然在任何这些位点可以出现具有保留的分子结合 EGFR-能力的单取代。

DNA 构建体

编码不同 EGFR 多肽结合物的 DNA 片段被亚克隆进表达载体 pAY442 和 pAY430。使用在 3'和 5'都导入 AccI 位点的特异性引物从载体 pAffi1 扩增片段，并与用同样酶预先限制的 pAY442 和 pAY430 载体连接，并使用牛小肠碱性磷酸酶(CIAP; Fermentas)去磷酸化。使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)纯化扩增的 DNA 片段并杂交，然后用 T4 DNA 连接酶(New England Biolabs)连接。连接产生表示为 pAY442-Z_{EGFR:n0} 和 pAY430-Z_{EGFR:n0} 的表达载体，编码与 N 末端 His₆ 标记融合的不同多肽结合物，通过固定金属离子亲和层析(IMAC)纯化。在转化的大肠杆菌细胞培养过夜后，按照厂商说明书使用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒进行所有的质粒制备。

蛋白质生产和纯化

选择的多肽结合物从大肠杆菌菌株 BL21(DE3)内的 pAY442 和 pAY430 质粒中表达为 His₆-标记的融合蛋白。

细胞接种于含有 50 mg/l 卡那霉素的 5ml TSB 培养基中(30g/L 胰蛋白酶大豆肉汤),并在深孔平板中生长过夜, 37°C, ~150rpm。添加了 5g/l 酵母提取物和 50mg/l 卡那霉素的新鲜 TSB (5ml) 用 20 μ l 过夜培养物接种, 细胞 37°C 生长 4 小时, 当加入异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 到达终浓度 1mM 时诱导基因表达。25°C 过夜培养后, 离心(10000g, 10 分钟)收获细胞并冻融(-80°C, 40 分钟)裂解细胞。随后, 细胞沉淀重悬于尿素缓冲液(8M, pH 8.0)。在变性条件(Qiagen)下使用 BR3000 自动装置通过在 Ni-NTA Superflow 柱上的 IMAC 纯化回收 His₆-Z_{EGFR} 融合蛋白。使用低 pH 尿素缓冲液(8M, pH 4.5)洗脱结合的蛋白质并且在 NAPTM-5 大小排阻层析柱(Amersham Biosciences)上通过改变缓冲液为 HBS (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005 %表面活性剂 P20, pH7.4)进行纯化的融合蛋白的复性。每个蛋白质使用合适的消光系数, 由 280nm 吸光度测量值计算多肽的蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 在 PhastgelTM 20%均匀凝胶上使用 Phast 系统(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)进一步分析纯化的多肽。通过氨基酸分析也确定选择的 Z_{EGFR} 变体的蛋白浓度 (Aminosyraanalyscentralen, Uppsala, Sweden)。

图 3 显示 SDS-PAGE 分析表达的和 IMAC-纯化的 EGFR-结合多肽 His₆-Z_{EGFR:942}(泳道 1)、His₆-Z_{EGFR:948}(泳道 2)、His₆-Z_{EGFR:955}(泳道 3)、His₆-(Z_{EGFR:942})₂(泳道 4)、His₆-(Z_{EGFR:948})₂(泳道 5)和 His₆-(Z_{EGFR:955})₂(泳道 6)。泳道 M, 蛋白标准分子量, 以千道尔顿表示。

生物传感器分析

使用 BIAcore® 2000 仪器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)用于选择的多肽结合物和靶蛋白质之间的实时生物特异性相互作用(BIA)。按照厂商说明书, EGFR-ECD (于 10mM NaAc, pH 4.5 中稀释)通过胺偶联固定(~2600RU)在 CM5 传感器芯片(Biacore)的一个流动池表面的羧化葡聚糖层上。激活并去活化另一个流动池表面以作为参考表面, HER2-ECD 和人 IgG (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)被固定在 CM5 传感器芯片上分开的流动池表面, 作为阴性对照。实验下的所有多肽结合物样品以运行缓冲液 HBS(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005%表面活性剂 P20, pH7.4)稀释并过滤(0.45 μ m; Millipore, Billerica, MA), 之后在 25°C 进行结合分析。在第一个实验中, 试验下的~1 μ M 每个多肽结合物 (HBS 稀释) 以流速 20 μ l/分钟

被注射所有表面。与 EGFR 无亲和力的不相关的 53 个氨基酸多肽结合物用作阴性对照,和天然配体 hEGF (Chemicon International, Temecula, CA, USA) 和商品单克隆抗体 cetuximab(MERCK Darmstadt, Germany)用作阳性对照,也都注射。在第二个实验中,单体 His₆-Z_{EGFR} 和二聚体 His₆-(Z_{EGFR})₂ 多肽结合物进行动力学分析,其中以 30μl/分钟的流速,浓度范围从 0.00625μM 到 12.8μM,蛋白被注射在 EGFR-ECD 表面。假定是一对一的结合,使用 BIAevaluation 3.2 软件(Biacore)计算解离平衡常数(K_D)、结合速率常数(k_a)和解离速率常数(k_D)。在第二个实验中,样品以随机顺序一式二份进行实验,每次注入后,注射 10mM HCl 再生流动池。生物传感器队列分析结果在表 1 和图 4 中描述。表 1 给出在 BIAcore 上生物传感器分析的一价和二价 EGFR-ECD 结合多肽结合物的动力学参数比较。通过基因重复策略,产生二聚化 EFGR-结合多肽构建体,如前述 Steffen et al Cancer Biother. & Radiopharmaceuticals, 20, 239-248 制备并亲和纯化。额外克隆测序后包括额外的多肽 Z_{EGFR:1239} (确定与 Z_{EGFR:955} 序列相关),并揭示了其作为单体性能的数据。解离平衡常数给出如下的 4 个 His₆-Z_{EGFR} 多肽结合物的亲和力排列 His₆-Z_{EGFR:1239} < His₆-Z_{EGFR:955} < His₆-Z_{EGFR: 948} < His₆-Z_{EGFR: 942}。

表 1

EGFR 结合多肽	K _D ^a (nM)	K _a ^b (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d ^c (s ⁻¹)
His ₆ -Z _{EGFR: 942}	~130	~3.0×10 ⁵	~4.0×10 ⁻²
His ₆ -(Z _{EGFR: 942}) ₂	~30	~6.0×10 ⁵	~1.6×10 ⁻²
His ₆ -Z _{EGFR: 948}	~180	~4.2×10 ⁵	~7.7×10 ⁻²
His ₆ -(Z _{EGFR: 948}) ₂	~40	~1.9×10 ⁵	~8.1×10 ⁻³
His ₆ -Z _{EGFR:955}	~190	~6.2×10 ⁴	~1.2×10 ⁻²
His ₆ -(Z _{EGFR:955}) ₂	~50	~4.8×10 ⁴	~2.4×10 ⁻³
His ₆ -Z _{EGFR:1239}	~490	~1.9×10 ⁵	~9.2×10 ⁻²

^a 解离平衡常数^b 结合速率常数^c 解离速率常数

体外结合分析可见,所有 4 个 EFGR-结合多肽以相当高的亲和力结合 EFGR 并且在它们的结合动力学特征上稍有不同。

图 4A 显示将纯化的 His₆-(Z_{EGFR:942})₂(正方形)、His₆-(Z_{EGFR:948})₂(三角形)和 His₆-(Z_{EGFR:955})₂(圆形)变体注射到含有胺偶联的 EGFR-ECD (闭合正方形/三角形/圆形)或 HER2-ECD (开放正方形/三角形/圆形)的传感器芯片流动池

表面之后获得的传感图结果。这证明 3 个 His₆-Z_{EGFR} 变体(His₆-Z_{EGFR:942}、His₆-Z_{EGFR:948} 和 His₆-Z_{EGFR:955})特异性结合 EGFR-ECD 固定流动池表面,但是未见与 HER2-ECD 固定的流动池表面的结合。

图 4B 显示将一价(灰线)和二价(黑线)EGFR-结合多肽注射到EGFR-ECD 流动池表面之后获得的传感图结果。图表显示 3 个候选的结合物,已证实一价和二价 EGFR-结合多肽解离速率(off-rate)不同,证明在第二代克隆中主要通过获得较慢解离速率实现了通过亲和力(avidity)作用改善表观亲和力(affinity)。

细胞培养

为如下的荧光团标记 FACS 和共焦显微镜研究,已知每个细胞表达 $\sim 2 \times 10^6$ EGFR 的人上皮癌细胞 A431 (European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, UK)在含有添加 10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸和 1%抗生素-抗真菌剂的 EMEM 培养基(所有试剂来自 Gibco, Invitrogen AB)的补充培养基中培养。细胞在 37 °C、含 5% CO₂ 的潮湿空气中培养。

荧光团标记

His₆-(Z_{EGFR:942})₂、His₆-(Z_{EGFR:948})₂ 和 His₆-(Z_{EGFR:955})₂ 多肽结合物用 Oregon Green® 488 马来酰亚胺 (Molecular Probes) 直接标记导入的半胱氨酸(在 C 末端)。大约 1mg His₆-(Z_{EGFR})₂ 多肽结合物重悬于 PBS 中并使用 20mM DTT 在 37°C 还原 45 分钟。多余的 DTT 通过用 PBS 平衡的 NAPTM-5 大小排阻柱子(Amersham Biosciences)去除。加入 20 倍摩尔过量的 10mM Oregon Green® 488 马来酰亚胺溶液,室温避光连续摇动 2 小时。对 PBS 进行广泛透析以去除多余的荧光团。依据厂商方案使用 280 和 496nm 吸光度测量值计算试验下荧光团标记的多肽结合物的浓度和标记性能。使用 Phast 系统(Amersham Biosciences)在 SDS-PAGE PhastgelTM Homogenous 20%凝胶上分析标记的多肽结合物。

FACS

在 FACS Vantage SE stream-in-air 流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)上进行流式细胞术分析。使用用于 488nm 的流式细胞仪校正珠(Molecular Probes, Leiden, The Netherlands)校正激光。样品用空气冷却氩激光(488nm)照射。以大约 300 次事件/秒的速度检测 10000 个细胞的荧光,前向和侧向散射光。用 CellQuest 软件(BD Biosciences)分析流式细胞术数据。

在流式细胞术分析之前,实验前~3天,种植在培养皿中的细胞被胰蛋白酶消化(0.25%胰蛋白酶, 37℃, 10分钟)。离心(582g, 3分钟)细胞,沉淀重悬于 PBS+1% BSA 中, 96孔培养板内每孔有等份的~300000个细胞。细胞与 10μg/ml 荧光团标记的 His₆-(Z_{EGFR})₂ 多肽结合物在冰上保温~30分钟。离心并用 PBS+1% BSA 洗后,细胞沉淀重悬于 300μl PBS+1% BSA 并进行流式细胞术分析。与 EGFR 无结合能力的相似多肽(His₆-标记的二聚化构建体)用作阴性对照。

这些研究结果在图 5 中显示。特别地,图 5 显示的流式细胞术分析结果证明 3 个候选结合物(His₆-(Z_{EGFR:942})₂、His₆-(Z_{EGFR:948})₂、His₆-(Z_{EGFR:955})₂)对于 A431 细胞上天然 EGFR 的亲力的排列。用作阴性对照(白色)的不相关的 Z 变体分子位于柱状图最左边。然后,3 个 Z_{EGFR} 结合物以如下顺序排列:His₆-(Z_{EGFR:942})₂(浅灰) < His₆-(Z_{EGFR:948})₂(灰色) < His₆-(Z_{EGFR:955})₂(黑色)。这些数据建议 Z_{EGFR:955} 可能是 3 个中最好的候选,尽管在 BIAcore 中它具有较低的亲和力,因为该测定是基于与细胞上天然 EGFR 的结合。

共焦显微术

在实验前一天,每 30mm 培养皿中接种大约 300000 A431 细胞。将测试的 His₆-(Z_{EGFR:942})₂、His₆-(Z_{EGFR:948})₂ 和 His₆-(Z_{EGFR:955})₂ 多肽结合物于完全 EMEM 培养基中稀释到大约 10μg/ml,加入到分开的培养皿中并避光保温 2 小时,37℃。测试的 3 个多肽结合物也如上于无血清 EMEM 培养基中稀释,加入分开的培养皿中并在冰上避光保温 1 小时。保温之后,细胞以正常培养基洗一次并加入一些培养基以用于共焦显微镜(LSM 5 Pascal; Zeiss)成像分析。进行连续扫描以覆盖细胞厚度并选择代表细胞中间的扫描。以同样方法分析作为阴性对照的、与 EGFR 没有亲力的相似多肽。

共焦显微术的结果示于图 6。特别地,图 6 显示 A431 细胞的共焦显微术图像,该细胞暴露于 Oregon Green 标记的 His₆-Z_{EGFR} 多肽 A)冰上 1 小时及 B)37℃, 2 小时。从左到右,可见 His₆-(Z_{EGFR:942})₂、His₆-(Z_{EGFR:948})₂ 和 His₆-(Z_{EGFR:955})₂ 在(A)中结合的和在(B)中内在化的细胞膜。结果证明 3 个 EGFR-结合多肽看上去,正如所预测的,结合细胞膜,并在 37℃保温时似乎发生内在化。

细胞培养

对于如下的放射性标记、特异性和饱和研究,细胞培养于 75cm² 培养

瓶和 24 孔平板(Nunc surface, Denmark)。对于标记方法, 使用 ^{125}I (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)、乙酸 (Merck Darmstadt, Germany)、氯胺-T(Sigma, USA)、焦亚硫酸钠(Aldrich, USA)和 N-琥珀酰亚胺-4-[3-三甲基甲锡烷基]苯甲酸盐(本实验室合成)。NAP-5 柱(Sephadex G-25, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)应用于凝胶过滤。使用胰蛋白酶-EDTA(0.25/0.02%)(Biochrom Kg)分离细胞并使用细胞计数器计数(Beckman Coulter Z2, Fullerton, CA, USA)。使用 gamma 计数器(1480 Wizard, Wallac Oy, Turku, Finland)测量放射性。使用富含 EGFR 的鳞状细胞癌细胞系 A431 (ATCC, CLR 1555, Rockville, MD, USA)。细胞培养于添加了 L-谷氨酰胺(2mM Biochrom Kg, Berlin, Germany)、PEST (青霉素 100IU/ml 和链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 10%胎牛血清(Biochrom Kg)的 Ham's F-10 培养基中("完全培养基")。细胞生长于 37°C、具有 5 % CO_2 平衡的潮湿空气的培养箱中。

放射性标记

多肽结合物 $Z_{\text{EGFR:942}}$ 、 $Z_{\text{EGFR:948}}$ 和 $Z_{\text{EGFR:955}}$ 的二聚体通过 N-琥珀酰亚胺基团用 ^{125}I 间接标记。将乙酸(2 μl , 0.1%乙酸于 milli-Q 中)和 N-琥珀酰亚胺-4-[3-三甲基甲锡烷基]苯甲酸盐(5 μl , 5%乙酸于甲醇中)加入 ^{125}I (15MBq)。通过加入 10 μl 氯胺-T 将碘偶联到 N-琥珀酰亚胺-4-[3-三甲基甲锡烷基]苯甲酸盐上。然后将溶液重悬 30 秒并进一步在室温保温 5 分钟。加入 15 μl 焦亚硫酸钠终止反应。于硼酸盐缓冲液中稀释多肽结合物并加入到碘溶液中, 并添加额外的硼酸盐缓冲液使总体积达到 150 μl , 于是溶液保温 30 分钟。为从低分子量化合物中分离标记的多肽结合物, 使用 PBS 平衡的 NAP-5 柱。

特异性测试

A431 细胞培养于 24 孔板并使用无血清 Ham's F-10 培养基洗一次。3 个二聚体化的被检测的多肽结合物被 ^{125}I 标记并加入细胞, 相对于可获得的受体数量其摩尔过量大约 10: 1, 并在 37°C 保温 4 小时。在一些孔中, 未标记的多肽结合物(摩尔过量大约 500: 1)和 [^{125}I]多肽结合物一起加入以确定非特异性结合。以同样方法使用 EGF (摩尔过量大约 200: 1) 和 cetuximab (摩尔过量大约 500: 1), 但是观察是否多肽结合物具有与 EGF 和 cetuximab 相同的结合位点。然后, 用无血清 Ham's F-10 培养基洗细胞 6 次并加入 0.5ml 胰蛋白酶-EDTA 分离细胞并在 37°C 保温 30 分钟或直到细胞被分开为止。加入 1ml Ham's F-10 完全培养基并且重悬细胞。在一些孔中,

0.5ml 悬液用于计数细胞。用 gamma 计数器检测放射性(分别取 1.5ml 和 1ml 细胞用于计数)。

结果在图 7 显示。特别地, 在图 7 中, 显示 $[^{125}\text{I}]$ (Z00942)₂(42*)、 $[^{125}\text{I}]$ (Z00948)₂(48*)和 $[^{125}\text{I}]$ (Z00955)₂(55*)的细胞结合。数据支持先前的 FACS-排列的结合物的未预料的结果, 其指示 $Z_{\text{EGFR:955}}$ 似乎是细胞上天然 EGFR 最好的结合物, 其次是 $Z_{\text{EGFR:948}}$ 和 $Z_{\text{EGFR:942}}$, 尽管事实是在 BIAcore 分析中, ($Z_{\text{EGFR:942}}$)₂ 显示出最高的亲和力。另外, 3 个 EGFR-结合多肽构建体似乎结合重叠表位。而且, 它们似乎都与天然配体 EGF 和单克隆抗体 cetuximab 竞争相同的结合位点。

饱和分析

测定多肽结合物结合饱和以确定亲和力常数。富含 EGFR 的细胞系 A431 培养于 24 孔平板。细胞置于冰上并在冷的无血清 Ham's F-10 培养基中洗一次。制备一系列稀释度的 ^{125}I 标记的多肽二聚化结合物并以摩尔过量大约 10: 1 加入细胞中。细胞在冰上置于如下的环境中保温 4 小时, 期间缓慢摇动: 来自孵箱的空气被限制在放有细胞平板的塑料袋中。对于每一个浓度, 也存在含有未标记多肽结合物的封闭对照, 其摩尔过量大约 300: 1 以评价非特异性结合。然后, 以冷的 Ham's F10 无血清培养基洗细胞 6 次并且加入 0.5ml 胰蛋白酶-EDTA 分离细胞和 37°C 保温 30 分钟或直到细胞被分离。加入 1ml Ham's F-10 完全培养基并重悬细胞。在一些孔中, 取 0.5ml 悬液用于计数细胞。用 gamma 计算器检测放射性。用 GraphPad Prism 4 分析数据。

结果显示在图 8 中。特别地, 在图 8 中, 显示 $[^{125}\text{I}]$ Z00942(A)、 $[^{125}\text{I}]$ Z00948 (B)和 $[^{125}\text{I}]$ Z00955(C)的饱和研究结果。显示从 3 个数值得出的均值和标准差。

实施例 2

本发明 EGFR-结合多肽的第二次选择

材料和方法

菌株和载体

琥珀抑制基因大肠杆菌菌株 RRIΔM15 (Rüther, U. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 5765-72)用于文库构建, 其作为细菌宿主用于噬菌体生产和克隆程

序。噬菌粒载体 pAffil 用于文库构建并在别处描述(Gronwall C, Jonsson A, Lindstrom S, Gunneriusson E, Stahl S, Heme N: "Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid beta peptides", J. Biotechnol. (2006) in press, Epub 27 Sep 2006)。选择的克隆的噬菌粒插入物被亚克隆到表达载体 pAY442 中, 其含有 T7 启动子(Studier et al., (1990) Methods Enzymol. 185, 60-89)、编码 6 组氨酸 (His₆) 标记和多克隆位点的 DNA 片段以及卡那霉素抗性基因。大肠杆菌菌株 BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI) 用于从表达载体制备蛋白质。

二级噬菌粒文库的构建

基于从 EGFR-结合分子(实施例 1, 图 2)第一轮选择出的 4 个序列的排列决定亲和力成熟策略。从编码蛋白质 Z 的螺旋 1 和 2 的、具有某些简并密码子的一条 129 个核苷酸的模板寡核苷酸(5' ctc gag gta gac aac aaa ttc aac aaa gaa nnk nnk nnk gcg nnk nnk gag atc mry mry tta cct aac tta aac ggt tgg caa atg acc gcc ttc atc gcg agt tta kyt gat gac cca agc caa agc 3')通过 PCR 扩增产生二级文库。使用正向引物 5'- cccccccccctcgaggtagacaacaaattcaa-3' (*Xho*I 位点, 下划线)和反向引物 5'- cccccctgctagcaagttagcgctttggcttgggtcatc-3' (*Nhe*I 位点, 下划线)以及用于每 95 个平行反应使用 1pmol 模板寡核苷酸扩增基因片段。使用 AmpliTaq Gold 聚合酶(Applied Biosystems, Foster City, CA)扩增 15 个循环(96°C 15 秒, 60°C 15 秒和 72°C 1 分钟)完成扩增, 合并产物, 使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)纯化, *Xho*I/*Nhe*I 消化和连接到 *Xho*I/*Nhe*I 消化的噬菌粒载体 pAffil 上, 该载体编码蛋白质 Z 的第三个 nonvariegated α 螺旋。连接的文库载体经 fenol: 氯仿: 异戊醇(25:24:21 v/v) (Invitrogen)抽提。在 ECM 630 装置(BTX, Genetronics)上以 2500V、125 Ω 和 50 μ F 使用 0.2-cm 空隙的样品池, 用 30 等份的连接材料转化电感受态大肠杆菌 RRIAM15 细胞。细胞在 SOC 培养基(胰蛋白胨大豆肉汤(TSB) + 酵母提取物(YE), 添加 1%葡萄糖, 10mmol/l MgCl₂, 10mmol/l MgSO₄, 10mmol/l NaCl 和 2.5mmol/l KCl)中在 37 °C 生长~1 小时并转移到 6 个锥形瓶中, 每个锥形瓶含有 1 升 TSB, 并添加 2%葡萄糖和 25 μ g/ml 羧苄青霉素并在 37°C 生长过夜。6000g (15min, 4°C)离心细胞, 随后重悬于 PBS/终浓度大约为 20%甘油的甘油溶液, 分装并储存在-80°C。

噬菌体选择步骤

在选择中使用~100 kDa 的 EGFR 重组胞外结构域(命名为 EGFR-ECD)作为靶蛋白(1095-ER; R&D Systems)。EGFR-ECD 在体外使用 EZ-Link™-Sulfo-NHS-LC-LC-生物素(Pierce, Rockford, IL, USA)生物素化, 20 倍摩尔过量的生物素加入于磷酸盐缓冲液(PBS; 10mM 磷酸盐, 137mM NaCl, pH 7.2)中的 EGFR-ECD 中, 混合物在室温(RT)保温 1 小时, 然后在 4℃ 以 PBS 广泛透析过夜(ON)以去除多余的生物素。

使用辅助噬菌体 M13K07(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)依据先前描述的程序(Nord, K et al., (1997) Nat. Biotechnol., 15, 772-777; Hansson et al., (1999) Immunotechnology, 4, 237-252)进行文库和选择之间的噬菌体原液的制备。PEG/NaCl 沉淀产生噬菌体滴度为大约 10^{13} 噬菌体形成单位(pfu)/ml。在溶液中进行选择并将结合的噬菌体捕获到链霉抗生物素蛋白包被的顺磁珠上(Dynabeads M-280 Streptavidin; Dynal, Oslo, Norway)。为避免非特异性结合, 所有试管用添加 5%牛血清白蛋白(PBST-5%BSA)的 PBST (0.1% Tween- 20 于 PBS 中)预处理。为进一步避免与存在于链霉抗生物素蛋白包被的顺磁珠上的链霉抗生物素蛋白结合, 在前两轮选择中~1ml 于 PBST-3%BSA 中的噬菌体原液用 0.2mg 珠预保温(30 分钟, 颠倒旋转)。

如下进行开始于 100nM 靶浓度的四轮生物淘选。在第 1 轮, 含有大约 10^{12} pfu 的等份文库在于 PBST-3%BSA 中的 1ml 100nM 生物素化 EGFR-ECD 中在室温保温 1 小时, 连续旋转, 随后在 4℃ ~72 小时。第 2 轮和第 3 轮于 1ml PBST-3%BSA 中的、分别为 50nM 和 1nM 生物素化 EGFR-ECD 与前一轮的部分噬菌体原液保温(1 小时, 室温, 连续颠倒旋转)。通过与链霉抗生物素蛋白包被的 M-280 Dynabeads 保温 15 分钟(室温, 连续颠倒旋转)捕获结合的噬菌体。正如前面 SDS-PAGE 分析所确定(结果未显示), 加入的珠量可以固定每 mg 珠~2μg 靶蛋白。第 4 轮, 如下表 2 中描述, 进行 6 种稍有不同的选择方案。在方案 4-A 和 4-B 中, 0.01nM 和 0.1nM 生物素化 EGFR-ECD 分别与前一轮的部分噬菌体原液在室温保温 2 小时, 随后与 100 倍过量的 EGFR-ECD 在室温保温 1 小时, 通过与链霉抗生物素蛋白包被的珠保温 15 分钟捕获结合的噬菌体, 洗 18 次, 与 100 倍过量的第一代 EGFR 结合物 Z00942、Z00948 和 Z00955(实施例 1)在室温保温 1 小时, 最终洗 2 次。在方案 4-C 中, 0.5nM 生物素化 EGFR-ECD 与前一轮的部分噬菌体原液在室温保温 2 小时, 随后通过与链霉抗生物素蛋白包被的珠保

温 15 分钟捕获结合的噬菌体，洗 18 次，与 100 倍过量的第一代 EGFR 结合物在室温保温 1 小时，最终洗 2 次。在方案 4-D 和 4-E 中，0.1 和 0.5nM 生物素化 EGFR-ECD 分别与前一轮的部分噬菌体原液在 37℃保温 2 小时，随后与 100 倍过量的 EGFR-ECD 在 37℃保温 1 小时，通过与链霉抗生物素蛋白包被的珠保温 15 分钟捕获结合的噬菌体，洗 18 次，与 100 倍过量的第一代 EGFR 结合物在 37℃保温 1 小时，最终洗 2 次。在方案 4-F 中，0.1nM 生物素化 EGFR-ECD 与前一轮的部分噬菌体原液在室温保温 2 小时，随后通过与链霉抗生物素蛋白包被的珠保温 15 分钟捕获结合的噬菌体并洗 20 次。在选择程序中，清洗步骤的次数保持恒定在 20 次，并在所有清洗步骤中均在 PBST- 3%BSA 中进行，除了最后一次清洗使用 PBST。噬菌体用 500μl 50mM 甘氨酸-HCl(pH2.1)洗脱 10 分钟，随后加入 50μl 1M Tris-HCl, pH 8.0 和 450μl PBS 立即中和。洗脱的噬菌体用于在 37℃感染对数期的 RRIΔM15 细胞 30 分钟。感染的细胞悬液涂布在添加 2%葡萄糖和 100mg/l 氨苄青霉素的 TYE 琼脂板上(15g/l 琼脂, 3g/l NaCl, 10g/l 胰蛋白胨和 5g/l 酵母提取物)，37℃保温过夜。通过在添加 5g/l 酵母提取物、2%葡萄糖和 100mg/l 氨苄青霉素的胰蛋白酶大豆肉汤中(TSB, 30g/l; Merck, Darmstadt, Germany)重悬来收集生长的菌落。级分(与洗脱后的噬菌体滴度比较~500 倍过量的细胞)用于接种，产生下一代噬菌体原液。使用辅助噬菌体 M13K07 从感染细胞中获得噬菌粒颗粒，使用 PEG 沉淀纯化并浓缩。在每个选择之前和洗脱之后滴定噬菌体原液监测选择过程。一系列稀释的噬菌体用于在室温感染对数期 RRIΔM15 细胞 5 分钟，随后铺板在添加 2%葡萄糖和 100mg/l 氨苄青霉素的 TYE 琼脂板上，37℃ ON。

表 2
第 4 轮选择方案

	4-A	4-B	4-C	4-D	4-E	4-F
用 bio-EGFR 保温	2h, RT	2h, RT	2h, RT	2h, 37℃	2h, 37℃	2h, RT
用 EGFR 保温（100 倍过量）	1h, RT	1h, RT	-	1h, 37℃	1h, 37℃	-
在链霉抗生物素蛋白包被的珠上捕获结合的噬菌体	15 分钟	15 分钟	15 分钟	15 分钟	15 分钟	15 分钟
洗涤	1-18	1-18	1-18	1-18	1-18	1-20
用第一代结合物保温（100 倍过量）	1h, RT	1h, RT	1h, RT	1h, 37℃	1h, 37℃	-

洗涤	19-20	19-20	19-20	19-20	19-20	-
----	-------	-------	-------	-------	-------	---

基于 ELISA 的第二代结合物的排列

单个克隆接种于添加 100 μ mol/l 异丙基-L-硫代- β -D-半乳糖吡喃糖苷 (IPTG)和 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 1ml TSB-YE 培养基的深孔板中(Nunc, Roskilde, Denmark), 并在 37 $^{\circ}$ C 生长过夜。以 3000g 离心 10 分钟沉淀细胞。于 300 μ l PBST 中重悬沉淀并在-80 $^{\circ}$ C 冻存过夜。样品解冻并以 3500g 离心 20 分钟。含有 ABD-标记的 Z 变体分子的上清液(100 μ l)加入微量滴定孔中, 其已被于 15mmol/l Na_2CO_3 和 35mmol/l NaHCO_3 (pH 9.6)中的 6 μ g/ml HAS (A-3782; Sigma)在 4 $^{\circ}$ C 预先包被 ON 并用于 PBST 中的 2%脱脂奶粉在室温封闭 1 小时(连续摇动)。用 PBST 洗平板 4 次, 之后每孔加入 50 μ l 8.4 μ g/ml 生物素化 EGFR-ECD 并且保温 1.5 小时。用 PBST 洗孔 4 次之后, 每孔加入 50 μ l 链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(1:5000, DAKO Cytomation, Denmark)并保温 1 小时。洗孔 4 次并每孔加入 50 μ l 显色溶液 ImmunoPure TMB 底物试剂盒(Pierce)。30 分钟后, 每孔加入 100 μ l 终止溶液(2M H_2SO_4)。用 Tecan Sunrise 分光光度计测量 450nm 吸光度。

DNA 测序和序列聚类

对第四轮淘选获得的 187 个 EGFR-结合克隆进行嗜菌粒(pAffil)插入物的 DNA 测序。使用特异引物和 Big Dye 终止物(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), 在 DNA 序列仪 ABI PRISM $^{\circledR}$ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)上分析 Sanger 片段。同样程序验证亚克隆的 DNA 片段。使用 Orlova et al. (Cancer Res. 66, 4339-48 (2006)) 详细描述的有关平均-连接等级聚类方法(average-link hierarchical clustering method)对 EGFR-结合多肽的序列分类。

在前部分描述的 ELISA 筛选中显示结合 EGFR 的候选多肽的推测的氨基酸序列是本发明 EGFR-结合多肽的实例。它们在图 1 中显示和在 SEQ ID NO: 174-309 中列出序列。每个这样结合多肽的相应 EGFR-结合基序的序列在图 1 中显示和在 SEQ ID NO: 11-146 中列出序列。

用 Biacore 筛选 EGFR-结合多肽

制备用于 ELISA 的噬菌体 pAffi-载体生成的含有 ABD-标记的 Z 变体的细胞上清也进行生物传感器分析。在 Biacore $^{\circledR}$ 2000 仪器上用实时生物特异性相互作用分析 ELISA 证明具有良好结合的 54 个克隆的上清。依据厂商说

说明书, 通过胺偶联将靶蛋白 EGFR-ECD(于 10mM NaAc, pH4.5 中稀释)固定 (~1200RU) 在一个 CM5 传感器芯片(Biacore)流动池表面的羧基葡聚糖层上。另一个流动池表面被激活和灭活以用作参照表面并且 HSA 被固定在 CM5 传感器芯片上分开的流动池表面, 用作表达的 ABD-标记的 Z 变体量的对照。实施例 1 的第一代 EGFR 结合物(Z00955)₂ 也被用作对照。

DNA 构建体

编码第二代 EGFR-结合 Z 变体(Z_{EGFR})的不同变体的 DNA 片段被亚克隆到表达载体 pAY442 中。用在 3'和 5'端导入 AccI 突出端的特异引物从 pAffil 载体扩增片段, 并连接到先前用相同酶限制和使用牛小肠碱性磷酸酶(CIAP; Fermentas, Ontario, Canada)去磷酸化的 pAY442 载体。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)纯化扩增的 DNA 片段并杂交, 之后用 T4 DNA 连接酶连接(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)。连接产生了编码在 T7 启动子的控制下的、与使得可以通过固定金属离子亲和层析(IMAC)纯化的 N 末端 His₆ 标记融合的不同 Z 变体的表达载体。构建来自 2 种载体的 EGFR-结合 Z 变体的二聚化构建体, 其中首位相连导入第二个 Z 变体基因片段, 产生 His₆-(Z_{EGFR})₂ 变体。过夜培养转化的大肠杆菌细胞后, 依据厂商说明书使用 QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH)进行所有质粒制备。

蛋白表达和纯化

选择的 EGFR-结合 Z 变体从大肠杆菌菌株 BL21(DE3)的 pAY442 质粒中表达为 His₆-标记的融合蛋白。细胞接种于 25ml 添加 5g/l 酵母(TSB+YE)和 50mg/l 卡那霉素的 TSB 培养基(30g/l 胰蛋白酶大豆肉汤), 37°C 振荡培养瓶中生长。含 50mg/l 卡那霉素的新鲜 TSB+YE 用预培养物接种至 OD₆₀₀ ~0.06 并在分批发酵罐中在 37°C 生长 3 小时, 当添加异丙基-L-硫代-β-D-半乳糖吡喃糖苷(IPTG; Apollo Scientific Ltd, Bradbury, UK)至终浓度 0.5mM 时诱导基因表达。培养 5 小时后, 离心收获细胞(15000g, 20 分钟)。细胞沉淀冻存过夜, 解冻并重悬于变性缓冲液(7M 尿素, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, pH8.0)。室温保温 30 分钟后, 25000g 离心细胞 15 分钟并且上清中的变性蛋白质于变性缓冲液(7M 尿素, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, pH 6.3)中稀释并应用于 Ni-NTA Superflow 柱(Qiagen)。使用尿素缓冲液(8M 尿素, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, pH 4.5)洗脱结合的蛋白质。蛋白质

应用于 PD-10 柱(GE Healthcare)并使用 PBS(pH7.4)洗脱。此后单体蛋白质命名为 $Z_{\text{EGFR:no}}(\text{pAY442 载体})$ 和二聚体蛋白质命名为 $(Z_{\text{EGFR:no}})_2(\text{pAY442 载体})$ 。对于每个蛋白质使用适当的消光系数,通过 280nm 检测的吸光度计算蛋白质浓度。为证实蛋白质的纯度和准确的分子量,将其进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel; Invitrogen)和 HPLC-MS(HPLC-MS 1100; Agilent Technologies)。通过 CD 进一步分析纯化的蛋白质,其中使用 Jasco-810 分光偏振计记录 16 个 EGFR-结合 Z 变体的 CD 光谱。使用 PBS 将所有构建体稀释到终浓度 0.5mg/ml 并将 200 μ l 每个样品置于 1mm 比色池中并在 20 °C 从 195 到 250nm 扫描。应用从 20 到 90 °C 温度梯度,在固定波长 220nm 检测热稳定性。熔点(定义为 50%蛋白质解折叠时的温度)通过解释热解折叠光谱而获得。通过氨基酸分析(Aminosyraanalyscentralen, Uppsala, Sweden)确定选择的 Z_{EGFR} 变体的蛋白质浓度。

生物传感器分析

Biacore® 2000 仪(Biacore AB, Uppsala, Sweden)用于选择的 Z 变体和靶蛋白质之间的实时生物特异性相互作用分析(BIA)。依据厂商说明书,EGFR-ECD (于 10mM NaAc 中稀释, pH 4.5)通过胺偶联被固定 (~2400RU) 在 CM5 传感器芯片(Biacore)的一个流动池表面的羧基葡聚糖层上。另一个流动池表面被活化和去活化以用作参照表面以及将 HER2-ECD (Horak et al, (2005) Cancer Biother Radiopharm. 20, 603-13) (由 Greg Adams, Fox Chase Cancer Center, PA 惠赠)和 ErbB3/Fc (R&D Systems, 348-RB)固定在 CM5 传感器芯片分开的流动池表面上作为阴性对照。在 25 °C 进行结合分析之前,所有 Z 变体样品于运行缓冲液 HBS(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005%表面活性剂 P20, pH 7.4)中稀释。在第一个实验中,500nM 每种 Z 变体(以 HBS 稀释)以 30 μ l/min 流速被注射布满所有表面。第一代 EGFR-结合分子($(Z_{\text{EGFR:955}})_2$; 实施例 1)作为对照也被注射。每次注射之后,通过注射 10 μ l 的 10mM HCl 再生流动池。

在第二个实验中,5 个选择的单体 Z_{EGFR} 变体进行动力学分析,其中浓度范围从 6.25nM 到 500nM 的蛋白质以 50 μ l/min 流速注射 EGFR-ECD 表面。使用 BIAevaluation 3.2 软件(Biacore)计算解离平衡常数 (K_D)、结合速率常数 (k_a) 和解离速率常数 (k_d)。样品一式二份进行实验并且每次注射后,通过注射 10 μ l 的 10mM HCl 再生流动池。

免疫荧光染色

从欧洲细胞培养物保藏中心(www.ecacc.org.uk)获得的细胞系 A431 在提供者建议的培养基中在 37℃、5%CO₂ 的环境中生长。培养基含有细胞系提供者(来自 Sigma-Aldrich)建议浓度的胎牛血清 (FBS)。亚铺满细胞使用 PBS 洗 1 次,以胰蛋白酶/EDTA 溶液(Cambrex)消化并重悬于完全生长培养基。在 8 孔多孔载玻片(Histolab)的每孔中加入 20μl 大约 10000 细胞并保温过夜。第二天早晨,以新鲜制备的 3%甲醛的 PBS 固定细胞 15 分钟并使用 PBS 洗 2 次。细胞以 20μl/孔的 Z 变体 His₆-Z01859、His₆-Z01865、His₆-Z01864、His₆-Z01877、His₆-Z01868、His₆-Z01913、His₆-Z01836、His₆-(Z01907)₂-Cys 和 His₆-(Z01953)₂-Cys(2-10μg/ml)染色 1 小时,或用 1μg/ml 小鼠抗-EGFR 抗体(Abeam, no. ab30)染色。Z 变体染色的载玻片以 PBS 洗涤,与混有 5μg/ml 抗-山羊 IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)的山羊抗 Z 抗体(内部制备)保温 1 小时。抗体染色的载玻片以 PBS 洗涤并与山羊抗小鼠 IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)保温 1 小时。在这次第二次保温步骤之后,载玻片以 PBS 清洗。抗体载玻片用 20μl 的 1μg/ml DAPI (Molecular Probes)复染 10-20 秒并清洗。所有载玻片干燥并加入抗褪色试剂(Vector Laboratories)并且使用装备 Leica DC 相机(Leica Microsystems)的 DM-LA 显微镜分析膜荧光。使用 IM1000 软件(Leica Microsystems)获得图像。

免疫组织化学染色

A431 异种移植组织得自如下描述的生物分配研究。肿瘤在液氮中急冻并使用 Ljung CM3000 自动化恒冷切片机(Leica Microsystems)将肿瘤切为 6μm 厚的冷冻切片。使用新鲜配制的 3%甲醛的 PBS 固定切片 15 分钟并以 PBS 洗 2 次。切片用浓度为 5μg/ml 的 His₆-(Z01864)₂-Cys 或 His₆-Z01877、用 1/40 稀释的大约 6μg/ml 的 His₆-(Z01907)₂-HRP 或 His₆-(Z01853)₂-HRP 染色 1 小时。用山羊抗 Z 抗体(内部制备)、之后是 5μg/ml 兔抗山羊 HRP 检测 His₆-(Z01864)₂-Cys 和 His₆-Z01877。作为阳性对照,一个载玻片用 3μg/ml 抗 EGFR 抗体(Abeam, no. ab2430)染色,洗涤并用兔 Envision HRP (Dako, no. K4002)检测。HRP 染色的样品以 PBS 洗 1 次,之后用 DAB 色原底物(Dako Cytomation)保温 7 分钟,之后以 PBS 洗并以 Mayers HTX (Histolab)复染 20 秒。使用 Mount-quick(Histolab)封片。使用装备 Leica DC 相机(Leica Microsystems)的 DMLA 显微镜分析载玻片。使用 IM1000 软件(Leica

Microsystems)获得和保存图像。

¹¹¹In 标记的 EGFR-结合 Z 变体的结合特异性和生物分布 放射性测量

使用具有 3 英寸 NaI(Tl)探测器的自动 gamma 计数器(1480 WIZARD, Wallac Oy, Turku, Finland)检测放射性。在 Cyclone™ Storage Phosphor System 上测量沿 ITLC 带的放射性分布并使用 OptiQuant™ 图像分析软件分析。

p-SCN-苯甲基-DTPA 与 Z 变体的偶联和 ¹¹¹In 缀合物的标记

使用螯合剂与蛋白质摩尔比例 1: 1, 依据 Mirzadeh 等(Bioconjug Chem. 1990; 1: 59-65)描述方法进行异硫氰酸-苯甲基-DTPA 与 Z_{EGFR} 变体的缀合。简言之, 300μl 的 Z 变体 PBS 溶液与溶于 0.07M 硼酸钠缓冲液 pH 9.2 的 43μl 新鲜制备的异硫氰酸-苯甲基-DTPA 溶液(1mg/ml)混合。用 0.07M 硼酸钠缓冲液(pH 8.5-9.0)调节总体积为 500μl, 之后混合物涡旋大约 30 秒并在 37°C 保温过夜。保温后, 依据厂商说明书将反应混合物在用 0.2M 醋酸盐缓冲液 pH5.3 预平衡的 NAP-5 大小排阻柱纯化(高分子量级分是 0.9ml)。洗脱液涡旋, 之后取出含有 50μg Z 变体缀合物的级分用于进一步标记而剩余溶液冻存。

用于标记, 50μg 缀合物与预先定量的 ¹¹¹In (18 MBq)混合并在室温保温 60 分钟。向异硫氰酸-苯甲基-DTPA 缀合物中加入 37μl 醋酸盐缓冲液以平衡这个 Z 变体的高浓度。

用于标记的质量控制, 使用用 0.2M 柠檬酸洗脱的 ITLC。在这个系统中, 放射标记的 Z 变体保持原貌, 游离铟迁移在溶剂前方, 并且 ¹¹¹In-异硫氰酸- DTPA 复合物具有 0.4 的 R_f。标记的缀合物在 NAP-5 柱(高分子级分是 0.9 ml)上纯化并在 ITLC 上检测产物纯度。

¹¹¹In 标记的缀合物与表达 EGFR 的 A431 细胞的结合特异性

将标记的缀合物以计算的比例为 1 个标记的缀合物/1 个 EGFR 受体(1.5×10^6 受体/A431 细胞)加入 2 组培养皿(每组 3 个培养皿)。一组培养皿在加入标记的缀合物之前用 100 倍过量的非标记 Z 变体预饱和 10 分钟。细胞在 37°C 保温 1 小时并收集保温培养基。细胞培养皿以冷的无血清培养基洗 6 次并用 0.5ml 胰蛋白酶-EDTA 在 37°C 处理 10 分钟。当细胞解离时, 每个皿中加入 0.5ml 完全培养基并重悬细胞。收集细胞悬液进行放射性测量。在自动 gamma 计数器上测量细胞相关放射性(C), 以 1ml 相应保温培养基(M)

作平行。与细胞结合的加入级分放射性计算为%结合放射性= $C \times 100 \% / (C + M)$ 。

动物肿瘤模型

动物研究经当地动物研究伦理委员会同意。雌性远交 Balb/c nu/nu 小鼠(到达时 10-12 周龄)用于体内实验。在肿瘤植入前,动物在 Rudbeck 实验动物设备中采用标准饮食,垫料和环境适应一个星期。小鼠自由取食和饮水。通过在右后腿皮下(s.c.)注射 $\sim 10^7$ 细胞移植 A431 肿瘤。异种移植生长 2 周。

生物分布研究

在携带 A431 肿瘤的 Balb/c (nu/nu)小鼠品系中在铟-111 标记的 EGFR Z 变体缀合物(s.c.)注射后 4 小时评估 EGFR 结合多肽的生物分布。在所有生物分布实验中注射后(pi) 4 小时通过腹膜内注射盐酸克他命(Ketalar, Pfizer)和盐酸甲苯噻嗪(Rompun; Bayer)混合物(20 μ l 溶液/克体重;克他命-10mg/ml, Rompun-1mg/ml)麻醉小鼠。其后,用使用稀释的肝素(5000 IE/ml, 来自 Leo Pharma, Copenhagen, Denmark)冲洗的 1ml 注射器通过心脏穿刺对小鼠实施安乐死。收集血液、肺、肝、脾、结肠、肾、子宫、唾液腺、肌肉、皮肤、骨和肿瘤的器官样品,称重并用 gamma 计数器测量放射性。肠(有内容物)作为整个器官进行测量并不称重。器官吸收值计算为注射的放射性/克组织的百分比(% IA/g)。在所有实验中,小鼠随机分组,每组 4 只动物。

结果

第一代 EGFR 结合 Z 变体的亲和力成熟

设计并构建亲和力成熟文库,其基于一组初级 EGFR 结合分子(实施例 1)。实施例 1 中 3 个最佳结合物的序列和来自进一步序列分析的第四个序列进行对比。固定 5 个位置(24, 25, 27, 28 和 32)并允许在第 17 和 18 位对于 N 和 R 以及在第 35 为对于 S 和 V(图 2D)具有某些偏好被认为是合理的。因此,使用简并密码子 NNG/T(图 2D),第 9、10、11、13 和 14 位被随机靶定。由于蛋白质 Z 小,有可能使用具有简并密码子的、编码 Z 结构域的螺旋 1 和 2 的单一 129 个核苷酸的寡核苷酸产生二级文库。PCR 扩增寡核苷酸并随后连接到编码蛋白质 Z 的第三个 α -螺旋的质粒载体上。产生的文库由 $\sim 1 \times 10^9$ 成员组成,其将包括大部分理论变体。基本按以上描述制

备噬菌体原液和进行选择，使用递减浓度的靶蛋白质并充分冲洗，同时用过量的非生物素化靶蛋白封闭具有快解离速率的结合物的重结合和用产生的第二代结合物与第一代结合物（实施例 1）竞争以在文库中选择最强的 EGFR 结合变体。

四轮选择后获得的克隆培养在 96 孔培养板，冻融以释放周质内容物，并进行 ELISA 筛选 EGFR 结合活性。当 372 个随机挑选的克隆用于 ELISA 筛选，大部分克隆证明有高吸收值，表明与靶蛋白质的良好结合。在具有最高吸收值的克隆中，186 个克隆进行 DNA 测序并根据测序克隆的聚类观察选择的克隆之间的关系。

而且，对 54 个克隆上含有 ABD 标记的 Z 变体的周质内容物进行生物传感器分析筛选以选择具有与 EGFR 最佳结合和最慢解离速率的克隆(数据未显示)。

基于 ELISA 筛选的数值，得自 DNA 测序的聚类结果和生物传感器分析筛选，选择 16 个克隆进一步定性，即 Z01836, Z01848, Z01853, Z01859, Z01864, Z01865, Z01868, Z01877, Z01887, Z01888, Z01905, Z01907, Z01908, Z01913, Z01917 和 Z01960 (见图 1 和序列列表)。实际上，所有结合物在浓度 $\geq 1.0\text{mg/ml}$ 时显示是可溶的并在远 UV 光谱区(190-250 nm)显示特征性的 α -螺旋形 CD 光谱，在 207 和 220nm 有最大吸收。熔点通过解释热解折叠光谱获得并且实际上对于所有结合物确定为 50°C 或更高。热变性后记录的光谱显示完全重新折叠为 α -螺旋结构。

生物传感器筛选

为获得最初的结合亲和力排列，表达 16 个选择的 Z 变体以及单体和二聚体 $Z_{\text{EGFR:955}}$ (实施例 1) 并使用 Biacore 仪器分析其 EGFR 结合。不同的 Z_{EGFR} 变体分别注射在传感器芯片流动池表面，其分别含有固定的靶蛋白 EGFR-ECD 和对照蛋白质 HER2-ECD 和 Fc 融合的 HER3。对于所有 16 个结合物观察到在低的纳摩尔范围的结合亲和力（数据未显示）。大多数结合物未显示与 HER2-ECD 和 Fc-融合的 HER3 的任何非特异性结合。选择具有最佳亲和力和生物传感器分析范围之外的 5 个结合物以进一步定性，即 Z01853, Z01868, Z01877, Z01907 和 Z01908。

体外比较第一代和第二代结合物

使用 Biacore 分析比较亲和力成熟的 Z01853, Z01868, Z01877, Z01907

和 Z01908 ($K_D \sim 10\text{nM}$)与 Z00955 的单体($K_D \sim 185\text{nM}$)和二聚体($K_D \sim 50\text{nM}$)形式(图 9)。亲和力成熟的 Z 变体的结合速率与第一代结合物单体和二聚体大约相同。然而,解离速率改良 ~ 20 倍。

荧光和免疫组化分析

结果显示在图 10 中。图 10A 显示用特异于 EGFR 的下列 Z 变体染色的 A431; a) His₆-Z01859, b) His₆-Z01865, c) His₆-Z01864, d) His₆-Z01913, e) His₆-Z01877, f) His₆-Z01868, g) His₆-Z01836, h) His₆-(Z01853)₂-cys 和 i) His₆-(Z01907)₂-cys。使用山羊抗 Z 抗体、随后用 Alexa 488 缀合的抗山羊抗体检测 Z 变体单体。用 Oregon Green 标记二聚化 Z 变体。作为阳性对照,用抗 EGFR 抗体染色 A431 (j)。

图 10B 显示用如下染色的 A431 异种移植物的冷冻切片: a) His₆-(Z01864)₂-Cys, b) His₆-Z01877, c) His₆-(Z01853)₂-Cys 和 d) His₆-(Z01907)₂-Cys。His₆-(Z01864)₂-Cys 和 His₆-Z01877 (a 和 b)用山羊抗 Z 抗体、随后用 HRP 缀合的抗山羊抗体检测。His₆-(Z01853)₂-Cys(c)和 His₆-(Z01907)₂-Cys(d)分子直接缀合到 HRP。作为阳性对照,用抗 EGFR 抗体染色 A431 (e)。

¹¹¹In-标记的 EGFR 结合 Z 变体的特异性和生物分布

所有 Z 变体缀合物用 indium-111 成功标记,标记产量超过 90%,并经 NAP-5 纯化后,所有缀合物纯度超过 95%。

在表达 EGFR 的鳞状细胞癌细胞系 A431 中评估标记的缀合物的结合特异性。结果显示在图 11。图中所有数据点是三次测量的平均值,误差条代表 SEM。发现所有缀合物的结合是 EGFR 特异的(见图 11),因此有可能通过添加 100 倍过量的非标记 Z_{EGFR} 阻止吸收($p < 0.0001$)。

在携带 A431 肿瘤的小鼠中注射 4 小时后铟-111 标记的 Z 变体缀合物的生物分布结果总结于图 12。图中,每个数据点代表 4 个动物平均值 $\pm$ 标准偏差,并表示为每克器官或组织中注射的放射性的百分比。通过 Erika Nordberg (Biomedical radiation Sciences, Uppsala University) 与 Affibody AB (VINNOVA)联合获得 ¹¹¹In-CHX-DTPA- (Z_{EGFR:955})₂ 数据并包括在本发明中用于比较。

使用 4-6 %IA/g 水平的所有 5 种新 Z 变体在体内成功靶定肿瘤,但是与非成熟的二聚体(4%IA/g)比较未见改良。

第一代二聚体(Z00955)₂ 和所有成熟单体之间的主要差别可见于血液清除、肝脏吸收和肾脏积累：在成熟实验中选择的新单体与(Z00955)₂ 比较，血液放射性浓度更高，肝脏吸收更低并且肾脏吸收更高。很可能，这些观察是相关的：肝脏中新单体与 EGFR 受体具有较弱的结合是由于与鼠受体具有更低的交叉反应性和/或由于与受体的单价结合，其不引发内在化和结合是可逆的。

实施例 3

本发明 EGFR 结合多肽的第三次选择

基于实施例 2 选择结果的统计学分析，基本上如上所述制备推定的 EGFR 结合多肽的第三个文库。在使用 EGFR 作为靶的噬菌体展示选择和 ELISA 筛选选择的变体后，鉴定了 EGFR 结合 Z 变体的 17 个额外序列。它们的氨基酸序列在图 1 以及序列表 SEQ ID NO: 310-326 中显示。这些 EGFR 结合 Z 变体的推测的 EGFR 结合基序示于图 1 以及序列表 SEQ ID NO: 147-163。

<110> 阿菲博迪公司

<120> 多肽

<130> 21029395

<150> GB 0524788.7

<151> 2005-12-05

<160> 329

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 1

Glu Trp Ser Ala Ala Ala Ser Glu Ile Ser Gly Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Lys Leu Gln Ala Phe Ala Phe Ile Val Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 2

Glu Met Leu Ile Ala Met Glu Glu Ile Gly Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Ala Phe Ile Leu Ser Leu Trp Asp
20 25

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 3

Glu Thr Gly Ala Ala Met Arg Glu Ile Asn Asp Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Asn Leu Gln Phe Phe Ala Phe Ile Val Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 4

Glu Phe Tyr Ala Ala Ile Thr Glu Ile Asn Arg Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Val Ala Phe Ile Ser Ser Leu Ser Asp
20 25

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 5

Glu His Ala Lys Ala Met Trp Glu Ile Gly Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Leu Val Gln Leu Ala Ala Phe Ile Phe Ser Leu Arg Asp
20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 6

Glu Ser Leu Ala Ala Ser Val Glu Ile Ser His Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Ser Gln Cys Lys Ala Phe Ile Arg Ser Leu Met Asp
20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 7

Glu Leu Glu Lys Ala Tyr Asn Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 8

Glu Ala Ala Pro Ala Trp Thr Glu Ile Val Arg Leu Pro Asn Leu Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Gly Gln Lys Gln Ala Phe Ile Val Ser Leu His Asp
 20 25

<210> 9
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 9

Glu	Leu	Trp	Ile	Ala	Thr	Ser	Glu	Ile	Val	Glu	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	

Met His Gln Gly Val Ala Phe Ile Arg Ser Leu Leu Asp
 20 25

<210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 10

Glu	Val	Gln	Asn	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Val	Lys	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	

Gly Trp Gln Ser Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Ser Asp
 20 25

<210> 11
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 11

Glu	Tyr	Glu	Glu	Ala	Trp	Asn	Glu	Ile	Arg	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 12
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 12

Glu	Ile	Glu	Arg	Ala	Met	Gln	Glu	Ile	Arg	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 13
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 13

Glu Val Glu Thr Ala Trp Met Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 14
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 14

Glu Thr Glu Thr Ala Ile Gln Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 15
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 15

Glu Thr Asp Arg Ala Val Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 16

Glu Met Trp Arg Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 17
 <211> 29
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 17

Glu Ser Gln Asp Ala Trp Glu Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 18

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 18

Glu Arg Glu Glu Ala Ile Lys Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 19

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 19

Glu Ser Trp Glu Ala Trp His Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 20

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 20

Glu Leu Tyr Asp Ala Met Ile Glu Ile Asn His Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 21

Glu Thr Asp Lys Ala Val Gln Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 22

Glu Gln Val Arg Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 23

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 23

Glu Leu Trp Gly Ala Trp Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 24

Glu Arg Asp Ala Ala Trp Glu Glu Ile Arg His Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 25

Glu Val Phe Pro Ala Leu Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 26
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 26

Glu Val Glu Met Ala Thr Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 27
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 27

Glu Leu Tyr Gln Ala Met Asp Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 28
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 28

Glu Ala Thr Glu Ala Trp Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 29
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 29

Glu Val Glu Trp Ala Leu Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 30
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 30

Glu Val Ser Pro Ala Leu Glu Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 31
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 31

Glu Arg Glu Arg Ala Ile Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 32
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 32

Glu Ala Glu Ser Ala Trp Asn Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 33
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 33

Glu Phe Trp Trp Ala Ser Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Ala Asp
 20 25

<210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 34

Glu Met Trp Ser Ala Trp Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 35

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 35

Glu His Trp Asn Ala Met His Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 36

Glu Val Glu Lys Ala Trp Ser Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 37

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 37

Glu Arg Glu Lys Ala Trp Met Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 38

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 38

Glu Met Trp Ser Ala Trp Ser Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 39
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 39

Glu Met Trp Ser Ala Trp Ala Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 40
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 40

Glu Arg Ser Leu Ala Ile Arg Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 41
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 41

Glu Arg Asp Thr Ala Ile Ser Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 42
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 42

Glu Met Trp Ala Ala Trp Gly Glu Ile His Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp

20 25

<210> 43
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 43

Glu Arg Asp Thr Ala Ile Tyr Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 44
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 44

Glu Pro Trp Leu Ala Trp Ala Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 45
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 45

Glu Met Trp Asp Ala Trp Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 46
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 46

Glu Asp Met Glu Ala Val Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 47
 <211> 29

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 47

Glu Ala Glu His Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 48
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 48

Glu Leu Trp Ile Ala Trp Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 49
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 49

Glu Met Trp Asn Ala Trp Ser Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 50
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 50

Glu Ile Asn Ser Ala Ile Gly Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 51
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 51

Glu Met Trp Arg Ala Trp Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 52

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 52

Glu Ser Trp Lys Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 53

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 53

Glu Thr Glu Trp Ala Ile Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 54

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 54

Glu Ala Glu Phe Ala Trp Thr Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 55

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 55

Glu Leu Leu Val Ala Met Leu Glu Ile Asn His Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 56
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 56

Glu Arg Asp Phe Ala Ile Asp Glu Ile His Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 57
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 57

Glu Met Trp Ile Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 58
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 58

Glu Ser Asn Ser Ala Trp Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 59
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 59

Glu Val Trp Thr Ala Trp Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 60
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 60

Glu Pro Trp Met Ala Trp Asp Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 61
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 61

Glu Arg Asp Gly Ala Ile Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 62
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 62

Glu Lys Trp Thr Ala Trp Glu Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 63
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 63

Glu Met Trp His Ala Trp Asp Glu Ile Arg His Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 64
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 64

Glu Val Asp Gln Ala Val Ala Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 65

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 65

Glu Arg Tyr Trp Ala Ile Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 66

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 66

Glu Arg Glu Glu Ala Ile Ser Glu Ile His Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 67

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 67

Glu Met Glu Trp Ala Trp Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 68

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 68

Glu Val Glu Pro Ala Ile Arg Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 69
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 69

Glu Gln Asp Glu Ala Val Lys Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 70
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 70

Glu Ala Asp Ser Ala Trp Thr Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 71
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 71

Glu Thr Asp Tyr Ala Ile Gly Glu Ile His Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 72
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 72

Glu Ala Asp Lys Ala Val Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 73
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 73

Glu Thr Asp Lys Ala Val Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 74
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 74

Glu Leu Trp Ala Ala Trp Ser Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 75
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 75

Glu Ala Trp Ala Ala Trp Ser Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 76
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 76

Glu Val Asp Arg Ala Val Val Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 77

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 77

Glu Ala Glu Ser Ala Ile Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 78
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 78

Glu Leu Gly Gly Ala Val Asn Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 79
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 79

Glu Val Asp Thr Ala Ile Trp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 80
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 80

Glu Leu Ala Asn Ala Phe Asp Glu Ile His Arg Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 81
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 81

Glu Phe Arg Arg Ala Ser Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Ala Asp
20 25

<210> 82

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 82

Glu Ile Glu Lys Ala Ile Arg Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 83

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 83

Glu Met Trp Glu Ala Trp Asp Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 84

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 84

Glu Ser Lys Trp Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 85

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 85

Glu Met Trp Arg Ala Trp Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn

1	5	10	15
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp	20	25	
<210> 86			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220>			
<223> Engineered EGFR binding polypeptide			
<400> 86			
Glu Ile Asp Pro Ala Leu Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn	5	10	15
1			
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp	20	25	
<210> 87			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220>			
<223> Engineered EGFR binding polypeptide			
<400> 87			
Glu Met Trp Ala Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn	5	10	15
1			
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp	20	25	
<210> 88			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220>			
<223> Engineered EGFR binding polypeptide			
<400> 88			
Glu Lys Tyr Trp Ala Val Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn	5	10	15
1			
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp	20	25	
<210> 89			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220>			
<223> Engineered EGFR binding polypeptide			
<400> 89			
Glu His Trp Ala Ala Trp His Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn	5	10	15
1			
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp	20	25	

<210> 90
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 90

Glu Tyr Gln Thr Ala Trp Lys Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 91
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 91

Glu Thr Asp Arg Ala Ile Lys Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 92
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 92

Glu Met Trp Asn Ala Trp His Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 93
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 93

Glu Pro Trp Val Ala Trp Asn Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 94
 <211> 29
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 94

Glu Leu Ile Gly Ala Tyr Asp Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Ala Asp
20 25

<210> 95

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 95

Glu Arg Asp Tyr Ala Leu Trp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 96

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 96

Glu Thr Gln Asp Ala Trp Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 97

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 97

Glu Met Trp Glu Ala Trp Gly Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 98

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 98

Glu Met Trp Ser Ala Trp His Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 99

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 99

Glu Leu Trp Gln Ala Trp Gly Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 100

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 100

Glu Val Glu Arg Ala Trp Asn Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 101

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 101

Glu Met Trp Glu Ala Trp Gly Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 102

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 102

Glu Arg Thr Gln Ala Ile Arg Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 103
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 103

Glu Thr Glu Glu Ala Trp Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 104
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 104

Glu Ala Glu Thr Ala Trp Ser Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 105
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 105

Glu Met Trp Cys Ala Trp Asn Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 106
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 106

Glu Arg Asp Tyr Ala Ile Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 107
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 107

Glu Met Trp Ser Ala Trp Asp Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 108
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 108

Glu Met Trp Thr Ala Trp His Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 109
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 109

Glu Thr Asp Arg Ala Val Arg Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 110
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 110

Glu Thr Trp Arg Ala Trp His Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 111
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 111

Glu Met Trp Leu Ala Trp Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 112

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 112

Glu Val Asp Tyr Ala Ile Gln Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 113

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 113

Glu Met Glu Ser Ala Trp Ile Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 114

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 114

Glu Thr Glu Glu Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 115

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 115

Glu Ser Glu Ala Ala Leu Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 116
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 116

Glu Phe Arg Lys Ala Ser Asn Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Ala Asp
20 25

<210> 117
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 117

Glu Val Gln Leu Ala Trp Asp Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 118
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 118

Glu Ala Asp Arg Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 119
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 119

Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Glu Ile His Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp

20	25
<210> 120	
<211> 29	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Engineered EGFR binding polypeptide	
<400> 120	
Glu Leu Asp Gln Ala Ile Leu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn	
1 5 10 15	
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp	
20 25	
<210> 121	
<211> 29	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Engineered EGFR binding polypeptide	
<400> 121	
Glu Pro Trp Ile Ala Trp His Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn	
1 5 10 15	
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp	
20 25	
<210> 122	
<211> 29	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Engineered EGFR binding polypeptide	
<400> 122	
Glu Arg Asp Val Ala Ile Thr Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn	
1 5 10 15	
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp	
20 25	
<210> 123	
<211> 29	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Engineered EGFR binding polypeptide	
<400> 123	
Glu Phe Asp Lys Ala Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn	
1 5 10 15	
Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp	
20 25	
<210> 124	
<211> 29	

<212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 124
 Glu Val Asp Val Ala Met Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 125
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 125
 Glu Thr Asn Ala Ala Leu Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 126
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 126
 Glu Ala Glu Lys Ala Trp Glu Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 127
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 127
 Glu Pro Trp Leu Ala Trp Ser Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 128
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 128

Glu Gly Leu Asn Ala Val Asn Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 129

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 129

Glu Trp Glu Val Ala Met Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 130

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 130

Glu Val Glu Ser Ala Trp Thr Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 131

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 131

Glu Thr Asp Arg Ala Trp Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 132

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 132

Glu Arg Glu Gln Ala Thr Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 133
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 133

Glu Met Glu His Ala Trp Glu Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 134
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 134

Glu His Trp Asn Ala Leu His Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Gly Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 135
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 135

Glu Tyr Glu Ala Ala Trp Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 136
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 136

Glu Gly Glu Met Ala Leu Gln Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 137
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

 <400> 137
 Glu Phe Arg Trp Ala Ser Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Ala Asp
 20 25

<210> 138
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

 <400> 138
 Glu His Trp Asn Ala Leu His Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 139
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

 <400> 139
 Glu Ile Asp Tyr Ala Ile Arg Glu Ile His Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25

<210> 140
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

 <400> 140
 Glu Leu Leu Gln Ala Met Leu Glu Ile Asn His Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

<210> 141
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 141
 Glu Val Asn Pro Ala Leu Gln Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25
 <210> 142
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 142
 Glu Leu Leu Ser Ala Met Leu Glu Ile Asn His Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25
 <210> 143
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 143
 Glu Arg Asp Glu Ala Ile Gln Glu Ile His Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25
 <210> 144
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 144
 Glu Thr Asp Trp Ala Ile Gln Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
 20 25
 <210> 145
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 145

Glu Met Glu Lys Ala Trp Val Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
20 25

<210> 146
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 146

Glu Leu Asp Asn Ala Ile Asp Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Phe Asp
20 25

<210> 147
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 147

Glu Met Trp Ile Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 148
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 148

Glu Met Trp Leu Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Leu Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 149
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 149

Glu Met Trp Ser Ala Trp Asp Glu Ile Arg Ala Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ser Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 150
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 150

Glu Met Trp Asn Ala Trp Asn Glu Ile Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 151
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 151

Glu Met Trp Gly Ala Trp Asn Glu Ile Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ser Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 152
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 152

Glu Met Trp Ile Ala Trp Asp Glu Ile Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Phe Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 153
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 153

Glu Leu Trp Ile Ala Trp Asp Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 154

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

 <400> 154
 Glu Met Trp Lys Ala Trp Glu Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
 20 25

 <210> 155
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

 <400> 155
 Glu Met Trp Asp Ala Trp Gly Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
 20 25

 <210> 156
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

 <400> 156
 Glu Val Trp Val Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
 20 25

 <210> 157
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

 <400> 157
 Glu Met Trp Gly Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
 1 5 10 15

 Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp
 20 25

 <210> 158
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 158

Glu Met Trp Met Ala Trp Asp Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Leu Thr Ala Phe Ile Ser Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 159

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 159

Glu Met Trp Val Ala Trp Glu Glu Ile Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Gly Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 160

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 160

Glu Met Trp Asp Ala Trp Asp Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Phe Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 161

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 161

Glu Leu Trp Gly Ala Trp Asp Glu Ile Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala Ser Leu Leu Asp
20 25

<210> 162

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 162

Glu Ser Trp Asn Ala Val Lys Glu Ile Gly Glu Leu Pro Asn Leu Asn

1	5	10	15
Trp Gly Gln Ala Asp Ala Phe Ile Asn Ser Leu Trp Asp	20	25	
<210> 163			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220>			
<223> Engineered EGFR binding polypeptide			
<400> 163			
Glu Ser His Glu Val Trp Gln Glu Ile Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn	5	10	15
1			
Gly Trp Gln Leu Thr Ala Phe Ile Asn Ser Leu Leu Asp	20	25	
<210> 164			
<211> 58			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220>			
<223> Engineered EGFR binding polypeptide			
<400> 164			
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Trp Ser Ala Ala Ala Ser Glu Ile	5	10	15
1			
Ser Gly Leu Pro Asn Leu Asn Lys Leu Gln Ala Phe Ala Phe Ile Val	20	25	30
Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala	35	40	45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys	50	55	
<210> 165			
<211> 58			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220>			
<223> Engineered EGFR binding polypeptide			
<400> 165			
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Leu Ile Ala Met Glu Glu Ile	5	10	15
1			
Gly Ser Leu Pro Asn Leu Asn Trp Gly Gln Glu Gln Ala Phe Ile Leu	20	25	30
Ser Leu Trp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala	35	40	45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys	50	55	

<210> 166
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 166

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Gly Ala Ala Met Arg Glu Ile
 1 5 10 15

Asn Asp Leu Pro Asn Leu Asn Asn Leu Gln Phe Phe Ala Phe Ile Val
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 167
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 167

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Phe Tyr Ala Ala Ile Thr Glu Ile
 1 5 10 15

Asn Arg Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Val Ala Phe Ile Ser
 20 25 30

Ser Leu Ser Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 168
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 168

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu His Ala Lys Ala Met Trp Glu Ile
 1 5 10 15

Gly Asn Leu Pro Asn Leu Asn Leu Val Gln Leu Ala Ala Phe Ile Phe
 20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 169
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 169

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser Leu Ala Ala Ser Val Glu Ile
 1 5 10 15

Ser His Leu Pro Asn Leu Asn Gly Ser Gln Cys Lys Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Ser Leu Met Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 170
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 170

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Glu Lys Ala Tyr Asn Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 171
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 171

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Ala Pro Ala Trp Thr Glu Ile
 1 5 10 15

Val Arg Leu Pro Asn Leu Asn Arg Gly Gln Lys Gln Ala Phe Ile Val
 20 25 30

Ser Leu His Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 172
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 172

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Trp Ile Ala Thr Ser Glu Ile
 1 5 10 15

Val Glu Leu Pro Asn Leu Asn Met His Gln Gly Val Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 173
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 173

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Gln Asn Ala Val Ala Glu Ile
 1 5 10 15

Val Lys Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Ser Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Ser Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 174
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 174

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Ala Trp Asn Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 178
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 178

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Asp Arg Ala Val Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 179
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 179

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Arg Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 180
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 180

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser Gln Asp Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 181
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 181

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Glu Glu Ala Ile Lys Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 182
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 182

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser Trp Glu Ala Trp His Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 183
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 183

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Tyr Asp Ala Met Ile Glu Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 184
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 184

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Asp Lys Ala Val Gln Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 185
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 185

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Val Arg Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 186
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 186

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Trp Gly Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35	40	45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
50	55	
<210> 187		
<211> 58		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Engineered EGFR binding polypeptide		
<400> 187		
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Ala Ala Trp Glu Glu Ile		
1	5	10 15
Arg His Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala		
	20	25 30
Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala		
	35	40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
50	55	
<210> 188		
<211> 58		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Engineered EGFR binding polypeptide		
<400> 188		
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Phe Pro Ala Leu Gln Glu Ile		
1	5	10 15
Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala		
	20	25 30
Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala		
	35	40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
50	55	
<210> 189		
<211> 58		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Engineered EGFR binding polypeptide		
<400> 189		
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Glu Met Ala Thr Gln Glu Ile		
1	5	10 15
Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala		
	20	25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 190
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 190

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Tyr Gln Ala Met Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 191
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 191

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Thr Glu Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 192
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 192

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Glu Trp Ala Leu Gln Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 193
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 193

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Ser Pro Ala Leu Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 194
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 194

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Glu Arg Ala Ile Glu Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 195
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 195

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Glu Ser Ala Trp Asn Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 196
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 196

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Phe Trp Trp Ala Ser Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Ala Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 197
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 197

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ser Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 198
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 198

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu His Trp Asn Ala Met His Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala

20	25	30
----	----	----

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 199
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 199

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Glu Lys Ala Trp Ser Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 200
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 200

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Glu Lys Ala Trp Met Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 201
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 201

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ser Ala Trp Ser Glu Ile
 1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 202
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 202

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ser Ala Trp Ala Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 203
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 203

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Ser Leu Ala Ile Arg Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 204
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 204

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Thr Ala Ile Ser Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 205
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 205

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ala Ala Trp Gly Glu Ile
1 5 10 15

His Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 206
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 206

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Thr Ala Ile Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 207
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 207

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Pro Trp Leu Ala Trp Ala Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 208

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 208

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Asp Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 209

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 209

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Asp Met Glu Ala Val Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 210

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 210

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Glu His Ala Trp Glu Glu Ile

1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 211
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 211

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Trp Ile Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 212
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 212

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Asn Ala Trp Ser Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 213
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 213

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ile Asn Ser Ala Ile Gly Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 214
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 214

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Arg Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 215
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 215

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser Trp Lys Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 216
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 216

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Glu Trp Ala Ile Gln Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 217
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 217

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Glu Phe Ala Trp Thr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 218
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 218

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Leu Val Ala Met Leu Glu Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 219
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 219

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Phe Ala Ile Asp Glu Ile
 1 5 10 15

His Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 220

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 220

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ile Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 221

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 221

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser Asn Ser Ala Trp Gln Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 222

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 222

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Trp Thr Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 223

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 223

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Pro Trp Met Ala Trp Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 224

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 224

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Gly Ala Ile Gln Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 225

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 225

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Lys Trp Thr Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 226

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 226

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp His Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg His Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 227

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 227

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Asp Gln Ala Val Ala Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 228

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 228

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Tyr Trp Ala Ile Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 229

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 229

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Glu Glu Ala Ile Ser Glu Ile
 1 5 10 15

His Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 230

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 230

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Glu Trp Ala Trp Gln Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 231

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 231

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Glu Pro Ala Ile Arg Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 232

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 232

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Asp Glu Ala Val Lys Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 233

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 233

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Asp Ser Ala Trp Thr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 234

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 234

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Asp Tyr Ala Ile Gly Glu Ile
1 5 10 15

His Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 235

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 235

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Asp Lys Ala Val Gln Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 236

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 236

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Asp Lys Ala Val Gln Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 237

<211> 58

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 237

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Trp Ala Ala Trp Ser Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 238
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 238

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Trp Ala Ala Trp Ser Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 239
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 239

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Asp Arg Ala Val Val Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 240

<211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 240

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Glu Ser Ala Ile Glu Glu Ile
 1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 241
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 241

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Gly Gly Ala Val Asn Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 242
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 242

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Asp Thr Ala Ile Trp Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 243
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 243

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Ala Asn Ala Phe Asp Glu Ile
 1 5 10 15

His Arg Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 244
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 244

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Phe Arg Arg Ala Ser Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Ala Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 245
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 245

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ile Glu Lys Ala Ile Arg Glu Ile
 1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 246
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 246

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Glu Ala Trp Asp Glu Ile
 1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 247
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 247

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser Lys Trp Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 248
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 248

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Arg Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 249
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 249

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ile Asp Pro Ala Leu Gln Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 250
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 250

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ala Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 251
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 251

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Lys Tyr Trp Ala Val Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 255
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 255

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Asn Ala Trp His Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 256
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 256

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Pro Trp Val Ala Trp Asn Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 257
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 257

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Ile Gly Ala Tyr Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Ala Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 258
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide
<400> 258

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Tyr Ala Leu Trp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 259
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide
<400> 259

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Gln Asp Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 260
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide
<400> 260

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Glu Ala Trp Gly Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 261
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 261

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ser Ala Trp His Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 262
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 262

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Trp Gln Ala Trp Gly Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 263
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 263

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Glu Arg Ala Trp Asn Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35	40	45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys 50 55		
<210> 264		
<211> 58		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Engineered EGFR binding polypeptide		
<400> 264		
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Glu Ala Trp Gly Glu Ile 1 5 10 15		
Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala 20 25 30		
Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala 35 40 45		
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys 50 55		
<210> 265		
<211> 58		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Engineered EGFR binding polypeptide		
<400> 265		
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Thr Gln Ala Ile Arg Glu Ile 1 5 10 15		
His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala 20 25 30		
Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala 35 40 45		
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys 50 55		
<210> 266		
<211> 58		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Engineered EGFR binding polypeptide		
<400> 266		
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Glu Glu Ala Trp Glu Glu Ile 1 5 10 15		
His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala 20 25 30		

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 267
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 267

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Glu Thr Ala Trp Ser Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 268
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 268

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Cys Ala Trp Asn Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 269
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 269

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Tyr Ala Ile Glu Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 270
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 270

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ser Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 271
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 271

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Thr Ala Trp His Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 272
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 272

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Asp Arg Ala Val Arg Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 273
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 273

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Trp Arg Ala Trp His Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 274
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 274

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Leu Ala Trp Gln Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 275
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 275

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Asp Tyr Ala Ile Gln Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala

20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 276
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 276

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Glu Ser Ala Trp Ile Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 277
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 277

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Glu Glu Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 278
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 278

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser Glu Ala Ala Leu Gln Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 279

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 279

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Phe Arg Lys Ala Ser Asn Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Ala Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 280

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 280

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Gln Leu Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 281

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 281

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Asp Arg Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 282
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 282

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Glu Ile
1 5 10 15

His Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 283
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 283

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Asp Gln Ala Ile Leu Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 284
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 284

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Pro Trp Ile Ala Trp His Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 285
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 285

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Val Ala Ile Thr Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 286
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 286

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Phe Asp Lys Ala Val Ser Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 287
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 287

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Asp Val Ala Met Gln Glu Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 288
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 288

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Asn Ala Ala Leu Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 289
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 289

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Glu Lys Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 290
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 290

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Pro Trp Leu Ala Trp Ser Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 291
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 291

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gly Leu Asn Ala Val Asn Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 292
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 292

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Trp Glu Val Ala Met Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 293
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 293

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Glu Ser Ala Trp Thr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 294
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 294

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Asp Arg Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 295
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 295

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Glu Gln Ala Thr Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 296
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 296

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Glu His Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 297

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 297

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu His Trp Asn Ala Leu His Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Gly Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 298

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 298

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Tyr Glu Ala Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 299

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 299

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gly Glu Met Ala Leu Gln Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 300

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 300

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Phe Arg Trp Ala Ser Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Ala Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 301

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 301

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu His Trp Asn Ala Leu His Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 302

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 302

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ile Asp Tyr Ala Ile Arg Glu Ile
1 5 10 15

His Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 303

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 303

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Leu Gln Ala Met Leu Glu Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 304

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 304

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Asn Pro Ala Leu Gln Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 305

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 305

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Leu Ser Ala Met Leu Glu Ile
 1 5 10 15

Asn His Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 306

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 306

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Arg Asp Glu Ala Ile Gln Glu Ile
 1 5 10 15

His Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 307

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 307

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Thr Asp Trp Ala Ile Gln Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 308

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 308

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Glu Lys Ala Trp Val Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 309

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 309

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Asp Asn Ala Ile Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Phe Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 310

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 310

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ile Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 311

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 311

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Leu Ala Trp Glu Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Leu Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 312

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 312

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ser Ala Trp Asp Glu Ile
1 5 10 15

Arg Ala Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ser
20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 313

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 313

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Asn Ala Trp Asn Glu Ile
1 5 10 15

Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 314

<211> 58

<212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 314
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Gly Ala Trp Asn Glu Ile
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ser
 20 25 30
 Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 315
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 315
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ile Ala Trp Asp Glu Ile
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Phe Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30
 Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 316
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 316
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Trp Ile Ala Trp Asp Glu Ile
 1 5 10 15
 Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30
 Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 317

<211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 317

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Lys Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 318
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 318

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Asp Ala Trp Gly Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 319
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 319

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Val Trp Val Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 320
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 320

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Gly Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 321
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 321

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Met Ala Trp Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Leu Thr Ala Phe Ile Ser
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 322
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 322

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Val Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Gly
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 323
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 323

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Asp Ala Trp Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Phe Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 324
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 324

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Trp Gly Ala Trp Asp Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Tyr Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 325
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide

<400> 325

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser Trp Asn Ala Val Lys Glu Ile
 1 5 10 15

Gly Glu Leu Pro Asn Leu Asn Trp Gly Gln Ala Asp Ala Phe Ile Asn
 20 25 30

Ser Leu Trp Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 326
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 326

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ser His Glu Val Trp Gln Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Leu Thr Ala Phe Ile Asn
 20 25 30

Ser Leu Leu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 327
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Engineered EGFR binding polypeptide
 <400> 327

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 328
 <211> 1210
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 328

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85 90 95
 Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100 105 110
 Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125
 Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140
 His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160
 Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175
 Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190
 Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205
 Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
 210 215 220
 Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255
 Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335
 Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350
 Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365
 Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr

370	375	380
Pro 385	Pro Leu Asp Pro Gln 390	Glu Leu Asp Ile Leu 395
Lys Thr Val Lys Glu 400	Thr Arg Thr Asp 415	Pro Glu Asn Arg Thr 415
Leu His Ala Phe 420	Glu Asn Leu Glu Ile 425	Ile Arg Gly Arg Thr 430
Lys Gln	His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val 440	Val Ser Leu Asn Ile 445
Thr Ser Leu	Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu 455	Ile Ser Asp Gly Asp 460
Val Ile Ile Ser	Gly Asn Lys Asn Leu Cys 470	Tyr Ala Asn Thr Ile 475
Lys Lys Leu	Phe Gly Thr Ser Gly 485	Gln Lys Thr Lys Ile 490
Gly Glu	Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val 505	Cys His Ala Leu Cys 510
Ser Pro	Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro 520	Arg Asp Cys Val Ser 525
Cys Arg Asn	Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys 535	Val Asp Lys Cys Asn 540
Leu Glu Gly	Glu Pro Arg Glu Phe Val 550	Glu Asn Ser Glu Cys 555
Ile Gln Cys His Pro 560	Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr 570	Cys Thr Gly Arg Gly 575
Pro	Asp Asn Cys Ile 580	Gln Cys Ala His Tyr 585
Ile Asp Gly Pro His 590	Cys Val	
Lys Thr Cys 595	Pro Ala Gly Val Met 600	Gly Glu Asn Asn Thr 605
Leu Val Trp	Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His 615	Val Cys His Leu Cys 620
His Pro Asn Cys	Thr Tyr Gly Cys Thr Gly 630	Pro Gly Leu Glu Gly 635
Cys Pro Thr Asn Gly 640	Pro Lys Ile Pro Ser 645	Ile Ala Thr Gly Met 650
Gly Ala Leu Leu Leu 655	Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile 665	Gly Leu Phe Met Arg 670
Arg Arg His	Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg 680	Arg Leu Leu Gln Glu 685
Arg Glu Leu		

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
 690 695 700
 Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735
 Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750
 Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765
 Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780
 Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800
 Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
 805 810 815
 Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
 820 825 830
 Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
 835 840 845
 Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
 850 855 860
 Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
 865 870 875 880
 Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895
 Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910
 Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925
 Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940
 Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960
 Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975
 Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005

Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
1010 1015 1020

Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
1025 1030 1035

Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
1040 1045 1050

Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
1055 1060 1065

Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
1070 1075 1080

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
1085 1090 1095

Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
1100 1105 1110

Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
1115 1120 1125

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
1130 1135 1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 329
<211> 621
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 329

Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln
1 5 10 15

Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
20 25 30

Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg

35	40	45
Asn Tyr Asp Leu Ser Phe 50	Leu Lys Thr Ile Gln 55	Glu Val Ala Gly Tyr 60
Val Leu Ile Ala Leu 65	Asn Thr Val Glu Arg 70	Ile Pro Leu Glu Asn Leu 75 80
Gln Ile Ile Arg 85	Gly Asn Met Tyr Tyr 90	Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala 95
Val Leu Ser 100	Asn Tyr Asp Ala Asn Lys 105	Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro 110
Met Arg Asn 115	Leu Gln Glu Ile Leu His Gly Ala Val 120	Arg Phe Ser Asn 125
Asn Pro Ala Leu Cys 130	Asn Val Glu Ser Ile Gln 135	Trp Arg Asp Ile Val 140
Ser Ser Asp Phe Leu 145	Ser Asn Met Ser Met 150	Asp Phe Gln Asn His Leu 155 160
Gly Ser Cys Gln 165	Lys Cys Asp Pro Ser Cys 170	Pro Asn Gly Ser Cys Trp 175
Gly Ala Gly 180	Glu Glu Asn Cys Gln Lys 185	Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala 190
Gln Gln Cys 195	Ser Gly Arg Cys Arg 200	Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys 205
His Asn Gln Cys Ala 210	Ala Gly Cys Thr Gly Pro 215	Arg Glu Ser Asp Cys 220
Leu Val Cys Arg Lys 225	Phe Arg Asp Glu Ala 230	Thr Cys Lys Asp Thr Cys 235 240
Pro Pro Leu Met 245	Leu Tyr Asn Pro Thr 250	Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn 255
Pro Glu Gly 260	Lys Tyr Ser Phe Gly Ala 265	Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro 270
Arg Asn Tyr 275	Val Val Thr Asp His 280	Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly 285
Ala Asp Ser Tyr Glu Met 290	Glu Glu Asp Gly Val 295	Arg Lys Cys Lys Lys 300
Cys Glu Gly Pro Cys 305	Arg Lys Val Cys Asn 310	Gly Ile Gly Ile Gly Glu 315 320
Phe Lys Asp Ser 325	Leu Ser Ile Asn Ala Thr 330	Asn Ile Lys His Phe Lys 335
Asn Cys Thr 340	Ser Ile Ser Gly Asp Leu 345	His Ile Leu Pro Val Ala Phe 350

Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
 355 360 365
 Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
 370 375 380
 Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
 385 390 395 400
 Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
 405 410 415
 Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
 420 425 430
 Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
 435 440 445
 Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr
 450 455 460
 Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
 465 470 475 480
 Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
 485 490 495
 Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val
 500 505 510
 Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
 515 520 525
 Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn
 530 535 540
 Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
 545 550 555 560
 Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
 565 570 575
 Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
 580 585 590
 Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
 595 600 605
 Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser
 610 615 620

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
EBM00940	EWSAASEISGLPNLNKLQAFIVSLVD	1
EBM00942	EMLIAMEEIGSLPNLNGQEQAFILSLVD	2
EBM00947	ETGAAMREINDLPNLNLIQFFAFIVSLVD	3
EBM00948	EYAAITEINRLPNLNGWQVAFISLSD	4
EBM00949	EHAKAMWEIGNLPNLIQLAAFIPLRD	5
EBM00951	ESLAASVEISHLPNLNGSQCKAFIRSLMD	6
EBM00955	ELEKAYNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	7
EBM00956	EAAPAWTEIVRLPNLNRGQKQAFIVSLHD	8
EBM00957	ELMIATSEIVELPNLMHQGVAFIRSLLD	9
EBM01239	EVQNAVAEIVKLPNLNGWQSTAFIASLSD	10
EBM01831	EYEEAWNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	11
EBM01832	EIERAMQEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	12
EBM01833	EVETAWMEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	13
EBM01834	ETETAIQEIRSLPNLNGWQMTAFIASLFD	14
EBM01835	ETDRAVEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFD	15
EBM01836	EMWRAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	16
EBM01837	ESQDAWEEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVD	17
EBM01838	EREEAIKEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	18
EBM01839	ESWEAWHEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	19
EBM01840	ELYDAMIEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVD	20
EBM01841	ETDKAVQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	21
EBM01842	EQVRAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	22
EBM01843	ELWGAWEEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVD	23
EBM01844	ERDAAWEEIRHLPNLNGWQMTAFIASLVD	24
EBM01845	EVFPALQEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFD	25
EBM01846	EVEMATQEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFD	26
EBM01847	ELYQAMDEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVD	27
EBM01848	EATEAWDEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	28
EBM01849	EVEWALQEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFD	29
EBM01850	EVSPALEEIRSLPNLNGWQMTAFIASLFD	30
EBM01851	ERERAIEEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	31
EBM01852	EAESAWNEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVD	32

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
EBM01853	EFWASDEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLAD	33
EBM01854	EMWSAWEEIHNLNLSNGWQMTAFIASLVD	34
EBM01855	EHWNAMHEIRSLPNLSNGWQMTAFIASLFD	35
EBM01856	EVEKAWSEIRSLPNLSNGWQMTAFIASLVD	36
EBM01857	EREKAWMEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	37
EBM01858	EMWSAWSEIHNLNLSNGWQMTAFIASLVD	38
EBM01859	EMWSAWAEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	39
EBM01860	ERSLAIREIHNLNLSNGWQMTAFIASLFD	40
EBM01861	ERDTAISEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	41
EBM01862	EMWAAWGEIHSLPNLSNGWQMTAFIASLVD	42
EBM01863	ERDTAIYEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	43
EBM01864	EPWLAWAEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	44
EBM01865	EMWDAAWEEIHNLNLSNGWQMTAFIASLVD	45
EBM01866	EDMEAVDEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	46
EBM01867	EAEHAWEEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	47
EBM01868	EIWIANDWEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	48
EBM01869	EMNNAWSEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	49
EBM01870	EINSAIGEIHNLNLSNGWQMTAFIASLFD	50
EBM01871	EMWRAWEEIHNLNLSNGWQMTAFIASLVD	51
EBM01872	ESWKAWEEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	52
EBM01873	ETEWAIQEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	53
EBM01874	EAEFAWTEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	54
EBM01875	ELLVAMLEINHLPNLSNGWQMTAFIASLVD	55
EBM01876	ERDFAIDEIHSLPNLSNGWQMTAFIASLFD	56
EBM01877	EMWIAWEEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	57
EBM01878	ESNSAWQEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	58
EBM01879	EVWTAWEEIHNLNLSNGWQMTAFIASLVD	59
EBM01880	EPWMAWDEIRSLPNLSNGWQMTAFIASLVD	60
EBM01881	ERDGAIQEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	61
EBM01882	EKWTAWEEIRSLPNLSNGWQMTAFIASLVD	62
EBM01883	EMWHAWDEIRHLPNLSNGWQMTAFIASLVD	63
EBM01884	EVDQAAVEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	64

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
EBM01885	ERYWAIEEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	65
EBM01886	EREEAISEIHSLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	66
EBM01887	EMEWAMQEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	67
EBM01888	EVEPAIREIHNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	68
EBM01889	EQDEAVKEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	69
EBM01890	EADSAWTEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	70
EBM01891	ETDYAIGEIHSLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	71
EBM01892	EADKAVQEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	72
EBM01893	ETDKAVQEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	73
EBM01894	ELWAAWSEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	74
EBM01895	EAWAAWSEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	75
EBM01896	EVDRAVVEIRSLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	76
EBM01897	EAESEAIEEIHNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	77
EBM01898	ELGGAVNEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	78
EBM01899	EVDTAIWEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	79
EBM01900	ELANAFDEIHRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	80
EBM01901	EFRRASDEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLAD	81
EBM01902	EIEKAIREIHNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	82
EBM01903	EMWEAWDEIHNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	83
EBM01904	ESKWAWEEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	84
EBM01905	EMWRAWEEIHNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	85
EBM01906	EIDPALQEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	86
EBM01907	EMWAAWEEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	87
EBM01908	EKYWAVDEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	88
EBM01909	EHWAAWHEIRSLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	89
EBM01910	EYQTAWKEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	90
EBM01911	ETDRAIKEIHNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	91
EBM01912	EMWNAWHEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	92
EBM01913	EPWVAWNEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	93
EBM01914	ELIGAYDEIRSLPNLPNNGWQMTAFIASLAD	94
EBM01915	ERDYALWEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLFD	95
EBM01916	ETQDAWDEIRNLPNLPNNGWQMTAFIASLVD	96

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
EBM01917	EMWEAWGEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVD	97
EBM01918	EMWSAWHEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVD	98
EBM01919	ELWQAWGEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	99
EBM01920	EVERAWNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	100
EBM01921	EMWEAWGEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVD	101
EBM01922	ERTQAIREIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	102
EBM01923	ETEEAWEEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVD	103
EBM01924	EAETAWSEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	104
EBM01925	EMWCANWEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	105
EBM01926	ERDYAIEEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	106
EBM01927	EMWSAWDEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVD	107
EBM01928	EMWTAWHEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVD	108
EBM01929	ETDRAVREIRNLPNLNGWQMTAFIASLFD	109
EBM01930	ETWRAWHEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVD	110
EBM01931	EMWLAWQEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	111
EBM01932	EVDYAIQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	112
EBM01933	EMESAWIEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	113
EBM01934	ETEEAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	114
EBM01935	ESEAAIQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	115
EBM01936	EFRKASNEIRSLPNLNGWQMTAFIASLAD	116
EBM01937	EVQLAWDEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVD	117
EBM01938	EADRAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	118
EBM01939	EIKPAIREIHSLPNLNGWQMTAFIASLFD	119
EBM01940	ELDQAILEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	120
EBM01941	EPWIAWHEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	121
EBM01942	ERDVAITEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	122
EBM01943	EFDKAVSEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFD	123
EBM01944	EVDVAMQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFD	124
EBM01945	ETNAALEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFD	125
EBM01946	EAEKAWEEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVD	126
EBM01947	EPWLAWSEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVD	127
EBM01948	EGLNAVNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFD	128

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
EBM01949	EWEVAMEEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	129
EBM01950	EVESAWTEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	130
EBM01951	ETDRAWDEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	131
EBM02268	EREQATEEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	132
EBM02269	EMEHAWEEIRSLPNLSNGWQMTAFIASLVD	133
EBM02270	EHWNALHEIRSLPNLSNGGQMTAFIASLFD	134
EBM02271	EYEAADWEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	135
EBM02272	EGEMALQEIIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	136
EBM02273	EFRWASDEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLAD	137
EBM02274	EHWNALHEIRSLPNLSNGWQMTAFIASLFD	138
EBM02275	EIDYAIREIHNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	139
EBM02276	ELLQAMLEIHNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	140
EBM02277	EVPALQEIIRSLPNLSNGWQMTAFIASLFD	141
EBM02278	ELLSAMLEIHNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	142
EBM02279	ERDEAIQEIHSNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	143
EBM02280	ETDWAIQEIIRSLPNLSNGWQMTAFIASLFD	144
EBM02281	EMEKAWVEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	145
EBM02282	ELDNAIDEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLFD	146
EBM02377	EMWIAWEEIRDLPNLSNGWQMTAFIASLDD	147
EBM02378	EMWLAWEEIRNLPNLSNGWQLTAFIASLDD	148
EBM02379	EMWSAWDEIRALPNLSNGWQMTAFISSLDD	149
EBM02380	EMWNAWNEIRDLPNLSNGWQMTAFIASLDD	150
EBM02381	EMWGAWNEIRDLPNLSNGWQMTAFISSLDD	151
EBM02382	EMWIAWDEIRDLPNLSNGWQMTAFIASLDD	152
EBM02383	ELWIAWDEIRYLPNLSNGWQMTAFIASLDD	153
EBM02384	EMWKAWEEIRSLPNLSNGWQMTAFIASLDD	154
EBM02385	EMWDANGEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLDD	155
EBM02386	EVVVAWEEIRDLPNLSNGWQMTAFIASLDD	156
EBM02387	EMWGAWEEIRNLPNLSNGWQMTAFIASLVD	157
EBM02388	EMWMAWDEIRYLPNLSNGWQLTAFISSLDD	158
EBM02389	EMWVAWEEIRNLPNLSNGWQMTAFIGSLDD	159
EBM02390	EMWDADWEIRYLPNLSNGWQMTAFIASLDD	160

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
EBM02391	ELWGAWDEIRYLPNLNGWQMTAFIASLLD	161
EBM02392	ESWNAVKEIGELPNLNGQADAFINSLWD	162
EBM02393	ESHEVWQEIIRSLPNLNGWQLTAFINSLD	163
Z00940	VDNKENKESWAAAASEISGLPNLNKLQAFIVSLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	164
Z00942	VDNKENKEMLIAMEEIGSLPNLNGWQEQAFILSLWDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	165
Z00947	VDNKENKETGAAMREINDLPNLNQLFFAFIVSLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	166
Z00948	VDNKENKEFYAAITEINRLPNLNGWQVAFISSLDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	167
Z00949	VDNKENKEHAKAMWEIGNLPNLNLVQLAAFIISLRDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	168
Z00951	VDNKENKESLAASVEISHLPNLNGSQCKAFIRSLMDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	169
Z00955	VDNKENKELEKAYNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	170
Z00956	VDNKENKEAAPAWTEIVRLPNLNRGQKQAFIVSLHDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	171
Z00957	VDNKENKELWIATSEIVELPNLNMHQVAFIRSLDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	172
Z01239	VDNKENKEVQNAVAEIVKLPNLNGWQSTAFIASLSDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	173
Z01831	VDNKENKEYEEAWEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	174
Z01832	VDNKENKEIERAMQEIIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	175
Z01833	VDNKENKEVETAWMEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	176
Z01834	VDNKENKETETAIOEIRSLPNLNGWQMTAFIASLFDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	177
Z01835	VDNKENKETDRAVEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	178
Z01836	VDNKENKEMWRAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	179
Z01837	VDNKENKESQDAWEEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	180
Z01838	VDNKENKEREEAIKEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	181
Z01839	VDNKENKESWEAWHEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	182
Z01840	VDNKENKELYDAMIEINHLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	183
Z01841	VDNKENKETDKAVQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	184
Z01842	VDNKENKEQVRAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	185
Z01843	VDNKENKELGWAWEEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	186
Z01844	VDNKENKERDAWEEIRHLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	187
Z01845	VDNKENKEVFPALQEIIRNLPNLNGWQMTAFIASLFDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	188
Z01846	VDNKENKEVEMATQEIIRNLPNLNGWQMTAFIASLFDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	189
Z01847	VDNKENKELYQAMDEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	190
Z01848	VDNKENKEATEAWDEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	191
Z01849	VDNKENKEVEWALQEIIRNLPNLNGWQMTAFIASLFDPSQSANLLAEAKKLINDAQAPK	192

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Z01850	VDNKENKEVSPALEEIRSLPNLNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	193
Z01851	VDNKENKERERAIEEIHNLPLNNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	194
Z01852	VDNKENKEAESAWNEIHNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	195
Z01853	VDNKENKEFWWASDEIRNLPLNNGWQMTAFIASLADDPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	196
Z01854	VDNKENKEMWSAWEIEIHNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	197
Z01855	VDNKENKEHWNAMHEIRSLPNLNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	198
Z01856	VDNKENKEVEKAWSEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	199
Z01857	VDNKENKEREKAWMEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	200
Z01858	VDNKENKEMWSAWSEIHNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	201
Z01859	VDNKENKEMWSAWAEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	202
Z01860	VDNKENKERSLAIREIHNLPLNNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	203
Z01861	VDNKENKERDTAISEIRNLPLNNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	204
Z01862	VDNKENKEMWAAWGEIHSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	205
Z01863	VDNKENKERDTAIYEIRNLPLNNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	206
Z01864	VDNKENKEPWLAWAEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	207
Z01865	VDNKENKEMWDAAWEEIHNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	208
Z01866	VDNKENKEDMEAVDEIRNLPLNNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	209
Z01867	VDNKENKEAEHAWEEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	210
Z01868	VDNKENKELWIAWDEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	211
Z01869	VDNKENKEMWNWSEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	212
Z01870	VDNKENKEINSAIGEIHNLPLNNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	213
Z01871	VDNKENKEMWRWAEIEIHNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	214
Z01872	VDNKENKESWKAWEEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	215
Z01873	VDNKENKETEWAIQEIRNLPLNNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	216
Z01874	VDNKENKEAEFAWTEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	217
Z01875	VDNKENKELLVAMLEIHNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	218
Z01876	VDNKENKERDFAIDEIHSLPNLNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	219
Z01877	VDNKENKEMWIAWEEIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	220
Z01878	VDNKENKESNSAWQEIIRNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	221
Z01879	VDNKENKEVWTAWEEIHNLPLNNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	222
Z01880	VDNKENKEPWWAWDEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	223
Z01881	VDNKENKERDGAIQEIRNLPLNNGWQMTAFIASLFDPPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	224

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Z01882	VDNKFNKEKWTAEIIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	225
Z01883	VDNKFNKEKMHAWDEIRHLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	226
Z01884	VDNKFNKEVDQAVAEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	227
Z01885	VDNKFNKERYWAEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	228
Z01886	VDNKFNKEEEEISEIHSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	229
Z01887	VDNKFNKEMEWAWQEIIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	230
Z01888	VDNKFNKEVEPAIREIHNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	231
Z01889	VDNKFNKEQDEAVKEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	232
Z01890	VDNKFNKEADSAWTEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	233
Z01891	VDNKFNKETDYAIGEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	234
Z01892	VDNKFNKEADKAVQEIIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	235
Z01893	VDNKFNKETDKAVQEIIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	236
Z01894	VDNKFNKEKELWAAWSEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	237
Z01895	VDNKFNKEAWAAWSEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	238
Z01896	VDNKFNKEVDRAVVEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	239
Z01897	VDNKFNKEAESAEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	240
Z01898	VDNKFNKEKLGAVNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	241
Z01899	VDNKFNKEVDTAIWEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	242
Z01900	VDNKFNKELANAFDEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	243
Z01901	VDNKFNKEFRRASDEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	244
Z01902	VDNKFNKEIEKAIREIHNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	245
Z01903	VDNKFNKEWAEWDEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	246
Z01904	VDNKFNKEKSWAEWDEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	247
Z01905	VDNKFNKEKMWRAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	248
Z01906	VDNKFNKEIDPALQEIIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	249
Z01907	VDNKFNKEWMAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	250
Z01908	VDNKFNKEKYWAVDEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	251
Z01909	VDNKFNKEHWAHWEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	252
Z01910	VDNKFNKEYQTAWKEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	253
Z01911	VDNKFNKETDRAIKEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	254
Z01912	VDNKFNKEWMAWHEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	255
Z01913	VDNKFNKEPWVAWHEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	256

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Z01914	VDNKFNKEL-GAYDEIRSLPNLNGWQMTAFIASLADDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	257
Z01915	VDNKFNKERDYALWEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	258
Z01916	VDNKFNKETQDAWDEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	259
Z01917	VDNKFNKEMFEAWGEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	260
Z01918	VDNKFNKEMFSAWHEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	261
Z01919	VDNKFNKELWQAWGEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	262
Z01920	VDNKFNKEVERAWNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	263
Z01921	VDNKFNKEMFEAWGEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	264
Z01922	VDNKFNKER ² QAIREIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	265
Z01923	VDNKFNKETEAEWEEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	266
Z01924	VDNKFNKETAETAWSEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	267
Z01925	VDNKFNKEMWCANWEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	268
Z01926	VDNKFNKERDYAIEEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	269
Z01927	VDNKFNKEMWSAWDEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	270
Z01928	VDNKFNKEMWTAWHEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	271
Z01929	VDNKFNKETDRAVREIRNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	272
Z01930	VDNKFNKETWRAWHEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	273
Z01931	VDNKFNKEMWLAWQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	274
Z01932	VDNKFNKEDVDYAIQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	275
Z01933	VDNKFNKEMESAWIEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	276
Z01934	VDNKFNKETEAEWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	277
Z01935	VDNKFNKESAAALQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	278
Z01936	VDNKFNKEFKASNEIRSLPNLNGWQMTAFIASLADDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	279
Z01937	VDNKFNKESVQLAWDEIRSLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	280
Z01938	VDNKFNKESADRAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	281
Z01939	VDNKFNKELDKPAIREIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	282
Z01940	VDNKFNKELDQAILEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	283
Z01941	VDNKFNKEPWIAWHEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	284
Z01942	VDNKFNKERDVAITEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	285
Z01943	VDNKFNKEDKAVSEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	286
Z01944	VDNKFNKESVDVAMQEIHNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	287
Z01945	VDNKFNKETNAALKEIRNLPNLNGWQMTAFIASLFDPPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	288

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Z01946	VDNKFENKEAEKAWEEIHNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	289
Z01947	VDNKFENKEPWLAWSEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	290
Z01948	VDNKFENKEGLNAVNEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	291
Z01949	VDNKFENKEWEVAMEEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	292
Z01950	VDNKFENKEVESAWTEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	293
Z01951	VDNKFENKETDRAWDEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	294
Z02268	VDNKFENKEREQATEEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	295
Z02269	VDNKFENKEMEHAWEEIRSLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	296
Z02270	VDNKFENKEHWNALHEIRSLPNLTNGGQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	297
Z02271	VDNKFENKEYEAAWDEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	298
Z02272	VDNKFENKEGEMALQEIIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	299
Z02273	VDNKFENKEFRWASDEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	300
Z02274	VDNKFENKEHWNALHEIRSLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	301
Z02275	VDNKFENKEIDYAIREIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	302
Z02276	VDNKFENKELLQAMLEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	303
Z02277	VDNKFENKEVNPALQEIIRSLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	304
Z02278	VDNKFENKELLQAMLEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	305
Z02279	VDNKFENKERDEAIQEIIRSLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	306
Z02280	VDNKFENKETDWAIQEIIRSLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	307
Z02281	VDNKFENKEMEKAWVEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	308
Z02282	VDNKFENKELDNAIDEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	309
Z02377	VDNKFENKEMWIAWEEIRDLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	310
Z02378	VDNKFENKEMWIAWEEIRDLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	311
Z02379	VDNKFENKEMWSAWDEIRALPNLTNGWQMTAFISSLLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	312
Z02380	VDNKFENKEMWNAWNEIRDLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	313
Z02381	VDNKFENKEMWNAWNEIRDLPNLTNGWQMTAFISSLLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	314
Z02382	VDNKFENKEMWIAWDEIRDLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	315
Z02383	VDNKFENKELWIAWDEIRYLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	316
Z02384	VDNKFENKEMWNAWEEIRSLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	317
Z02385	VDNKFENKEMWNAWEEIRSLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	318
Z02386	VDNKFENKEVWVAWEEIRDLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	319
Z02387	VDNKFENKEMWNAWEEIRNLPNLTNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	320

图1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Z02388	VDNKENKEMWMAWDEIRYLPNLTNGWQLTAFISLLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	321
Z02389	VDNKENKEMWVAWEEIRNLPNLTNGWQMTAFISLLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	322
Z02390	VDNKENKEMWDAWDEIRYLPNLTNGWQFTAFISLLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	323
Z02391	VDNKENKELWGAWDEIRYLPNLTNGWQMTAFISLLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	324
Z02392	VDNKENKESWNAVKEIGELPNLTNGWQADAFINSLLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	325
Z02393	VDNKENKESHEVWQEIIRSLPNLTNGWQLTAFINSLLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	326
Z00000	VDNKENKEQNAFYIEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	327
EGFR	MRPSGTAGALLAALCPASRALEEKVCQGTSNKLTQLGTGFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRYNDLSFLKTIQEVAGYVLIANTVERIIRGNMYEYNSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNQEIILHGAVRESNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCHNQCAAGCTGPRESDECLVCRKFRDEATCKDTCPPMLYNPTTYQMDVNPPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKCEGCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISGDLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKHQHGFSLAVSLNITSLGLRSLKEISDGDVYISGNKNLCYANTINWKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNSRGRECVCKNLLEGEPRFVENSECQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCPNC	328
EGFR ECD	LEKKVCQGTSNKLTQLGTGFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRYNDLSFLKTIQEVAGYVLIANTVERIIRGNMYEYNSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNQEIILHGAVRESNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCHNQCAAGCTGPRESDECLVCRKFRDEATCKDTCPPMLYNPTTYQMDVNPPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKCEGCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISGDLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKHQHGFSLAVSLNITSLGLRSLKEISDGDVYISGNKNLCYANTINWKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNSRGRECVCKNLLEGEPRFVENSECQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCPNC	329

图1

	螺旋1			螺旋2			螺旋3		
Zwt	VDNKENK	EQÑÑAFYELLÁ	LPNLNÉ	ÉQÑÑAFIQLKD	DPSQ	SANLLAEAKLND	QAPK		
Z _{EGFR} :940	----	-WSA-AS--SG	----K	L-AF--V-V-	----	----	1		
Z _{EGFR} :942	----	-MLI-ME--GS	----W	G-EQ--L-W-	----	----	45		
Z _{EGFR} :947	----	-TGA-MR--ND	----N	L-FF--V-V-	----	----	1		
Z _{EGFR} :948	----	-FYA-IT--NR	----G	W-MV--S-S-	----	----	1		
Z _{EGFR} :949	----	-HAK-MW--GN	----L	V-LA--F-R-	----	----	1		
Z _{EGFR} :951	----	-SLA-SV--SH	----G	S-CK--R-M-	----	----	1		
Z _{EGFR} :955	----	-LEK-YN--RN	----G	W-MT--A-V-	----	----	1		
Z _{EGFR} :956	----	-AAP-WT--VR	----R	G-KQ--V-H-	----	----	1		
Z _{EGFR} :957	----	-LWI-TS--VE	----M	H-GV--R-L-	----	----	1		
Z _{EGFR} :1239	----	-VQN-VA--VK	----G	W-ST--A-S-	----	----	1		

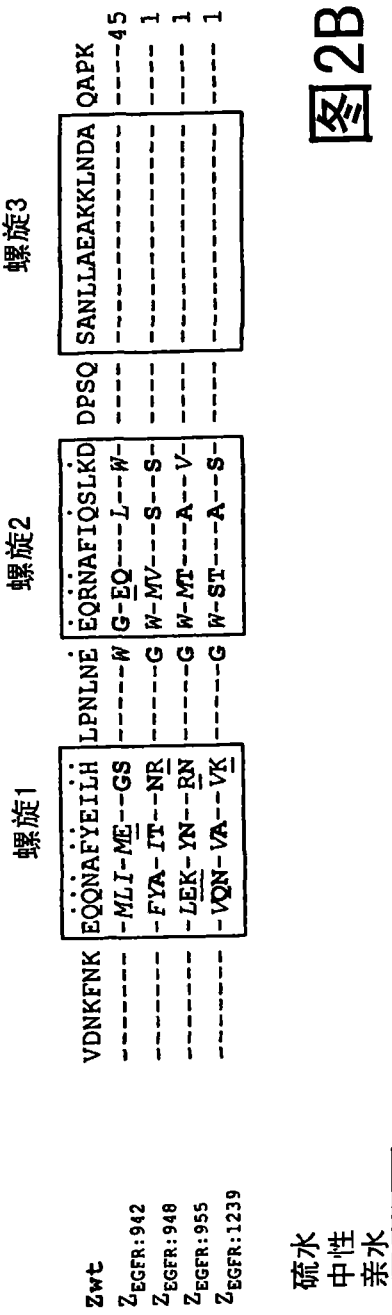
碱性: H, R, K

酸性:
D, E

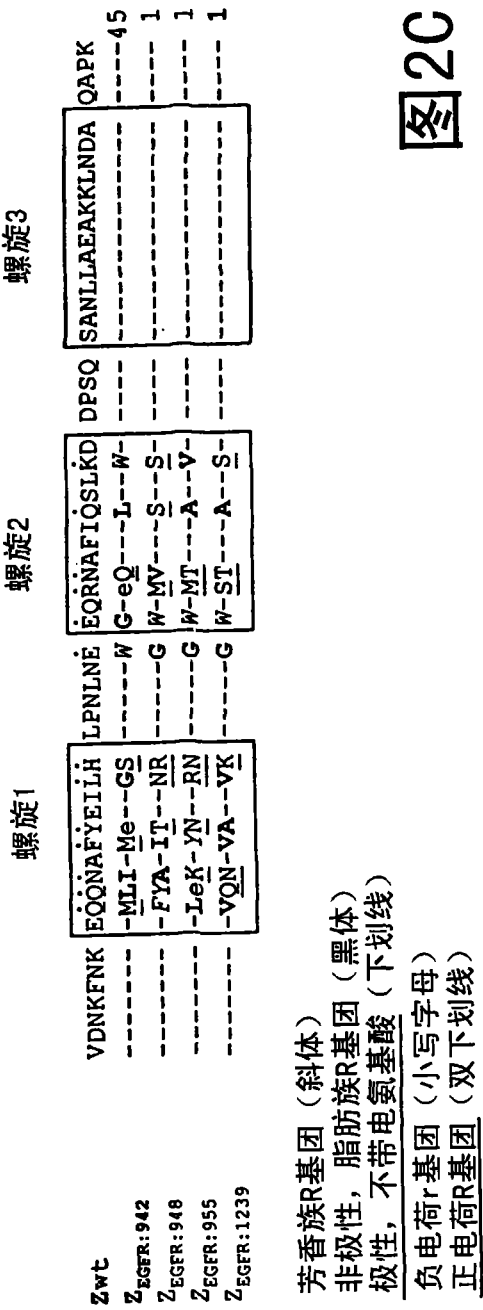
非极性:
G, I, F, A, L, M, W, P, V

极性: C, Q, N, S, Y, T, S

2A



疏水
中性
亲水



芳香族R基团 (斜体)
非极性, 脂肪族R基团 (黑体)
极性, 不带电氨基酸 (下划线)
负电荷r基团 (小写字母)
正电荷R基团 (双下划线)

亲和性成熟策略

9	10	11	13	14	17	18	24	25	27	28	32	35
X	X	X	X	X	N/R	N/R	G	W	M	T	A	S/V

图2D

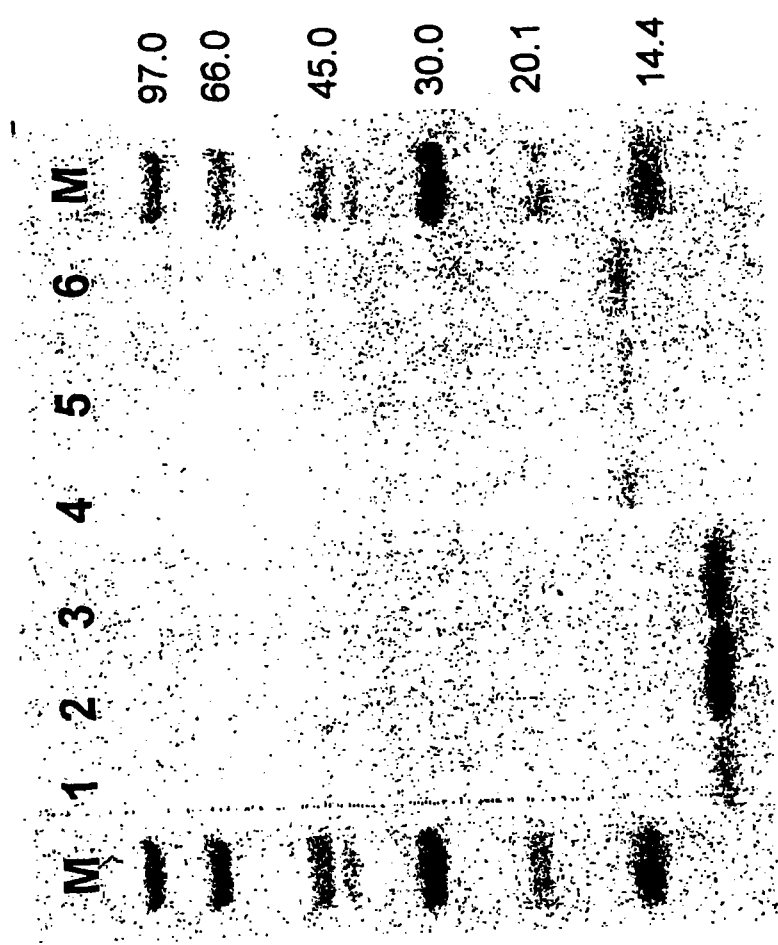


图3

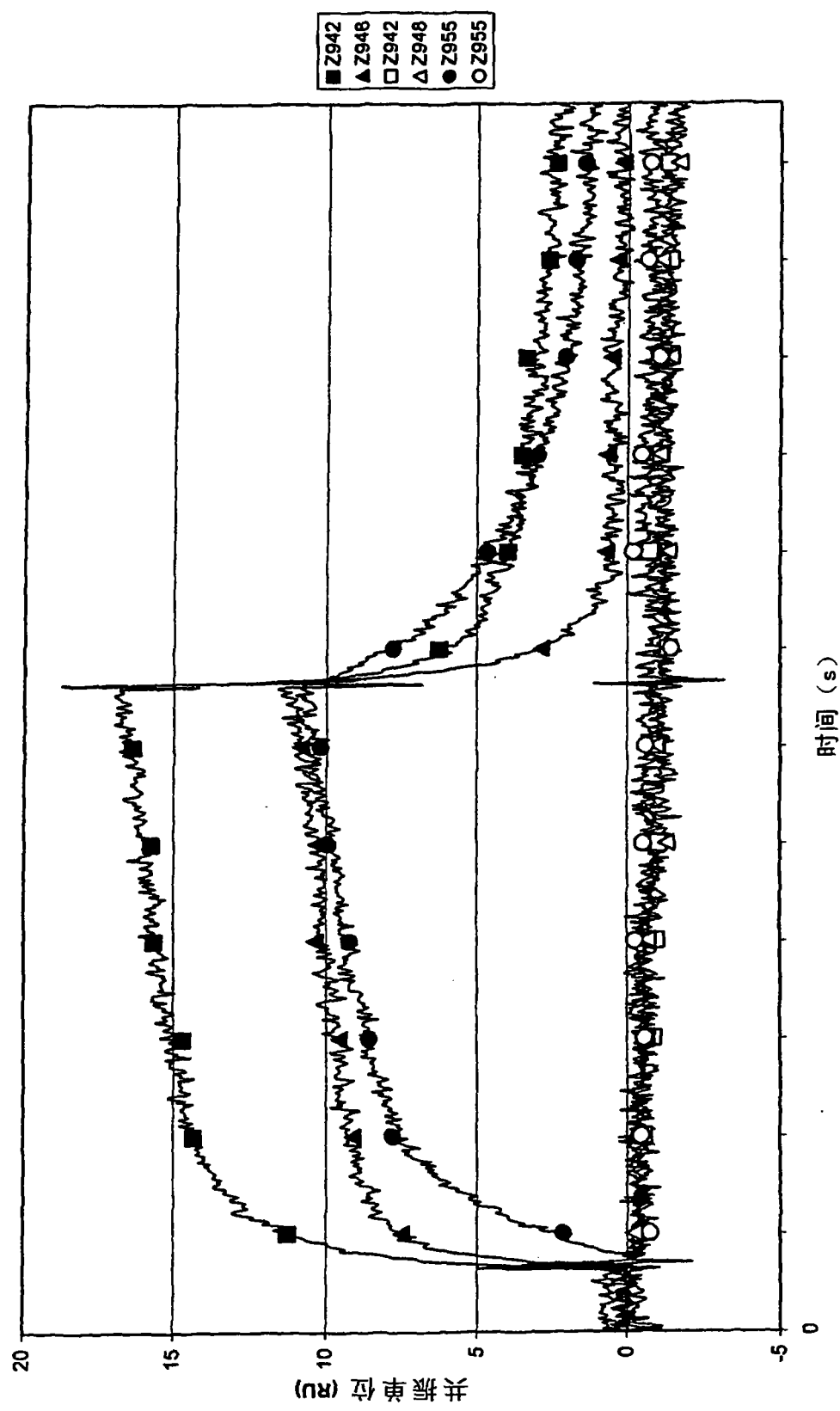
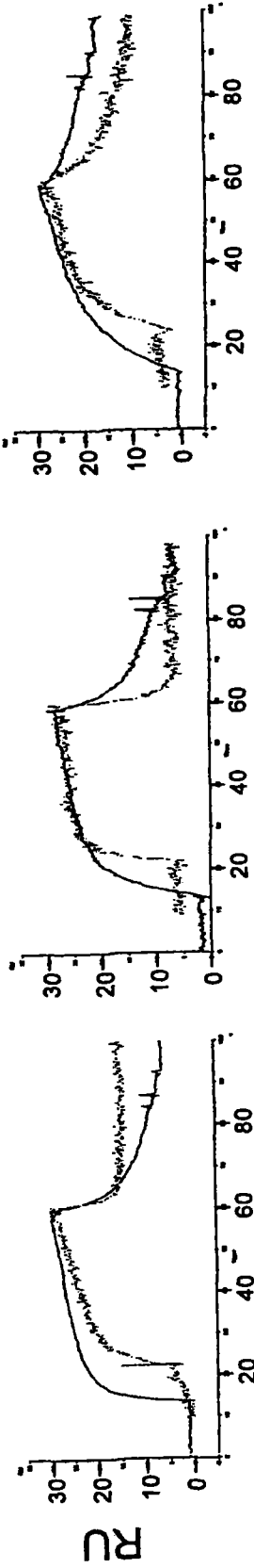


图4A



时间, 秒

图4B

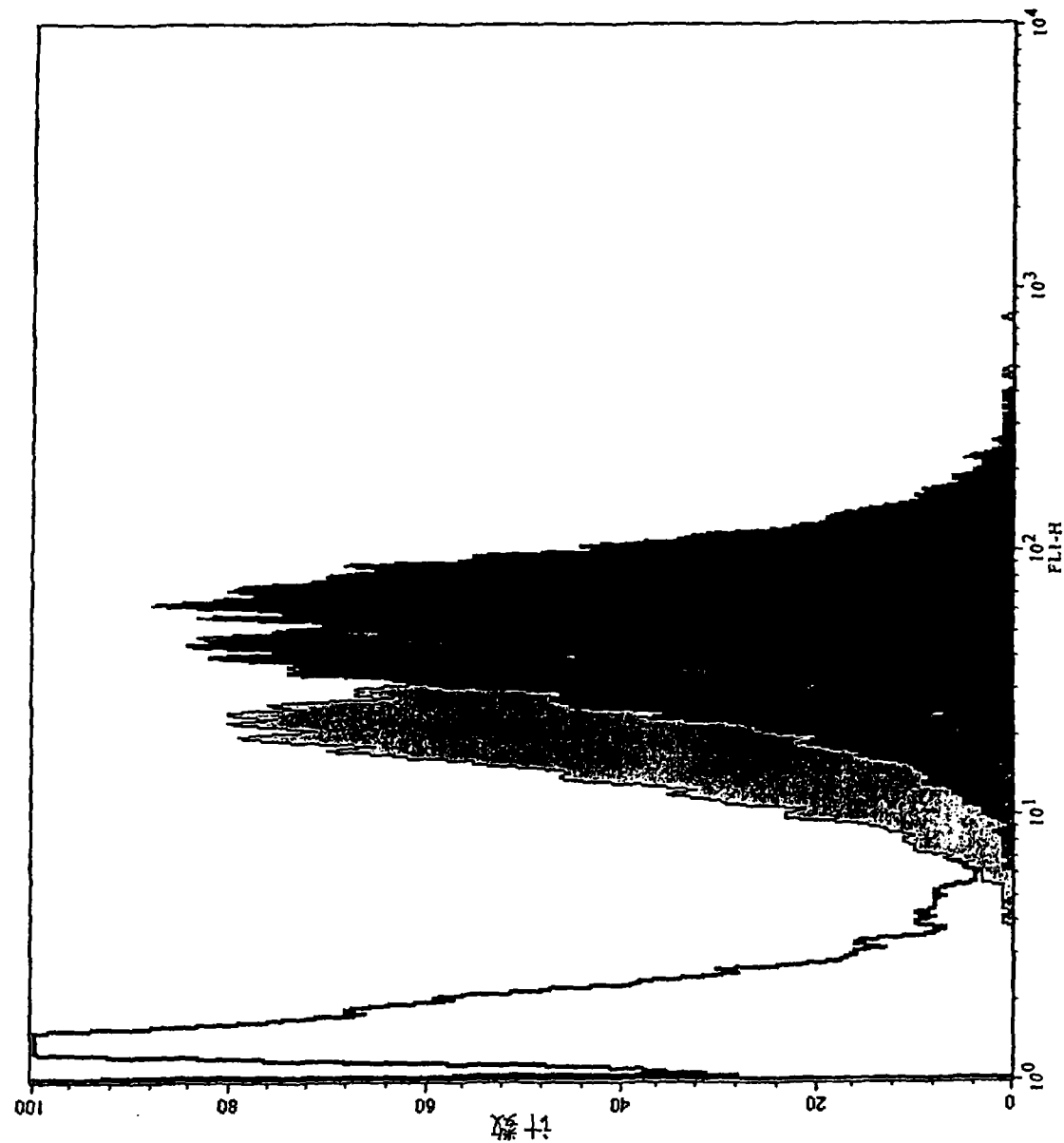
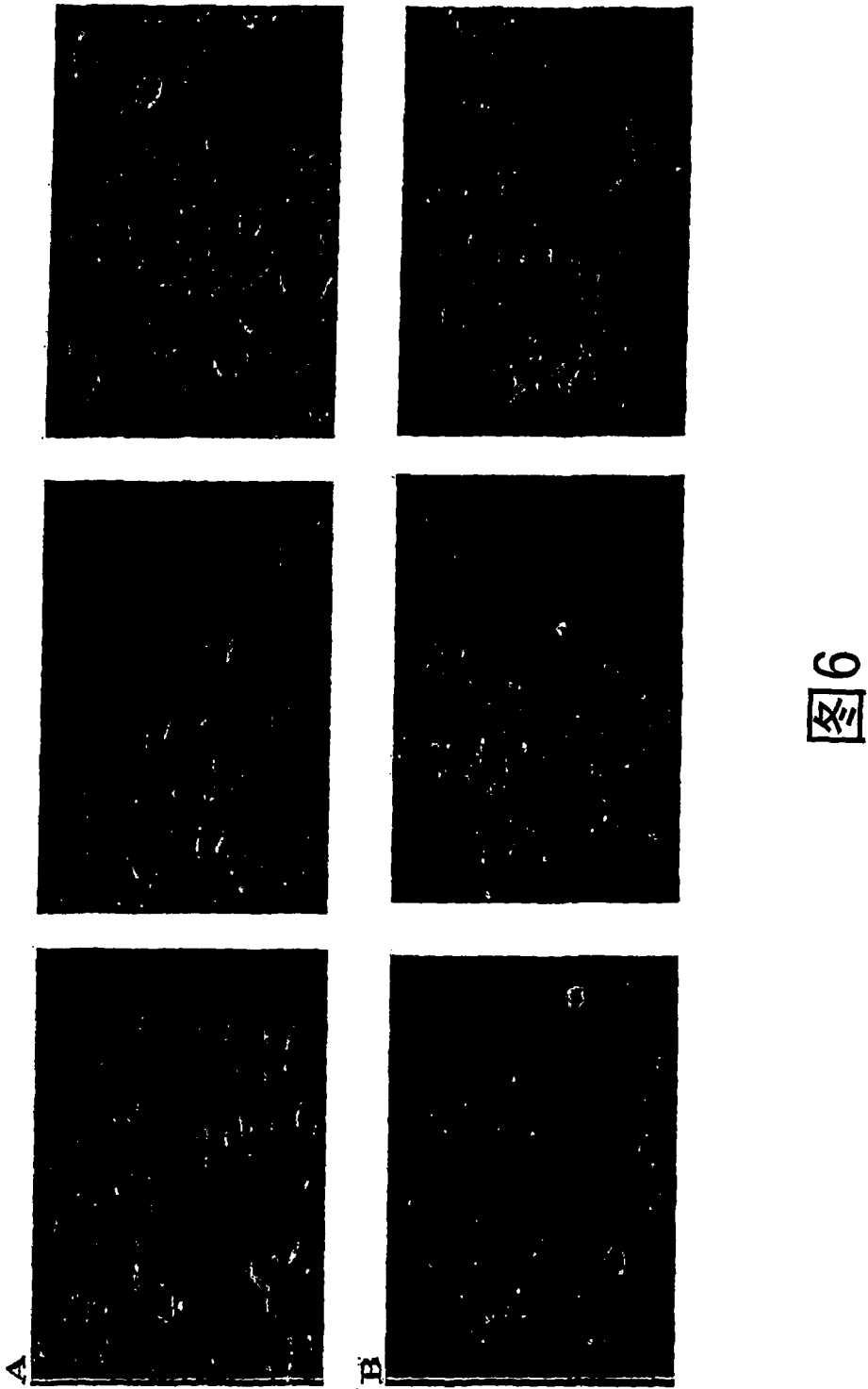


图5



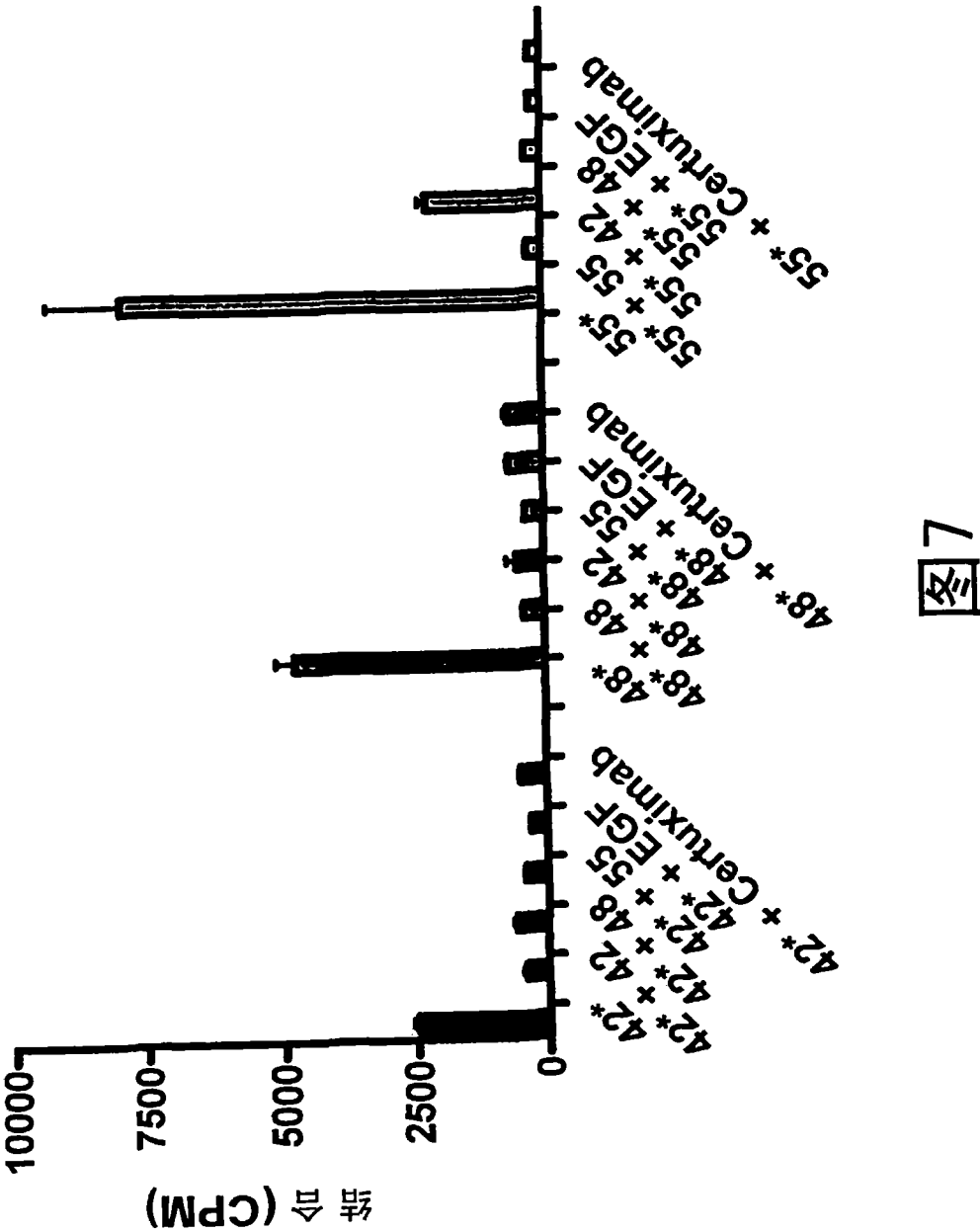


图7

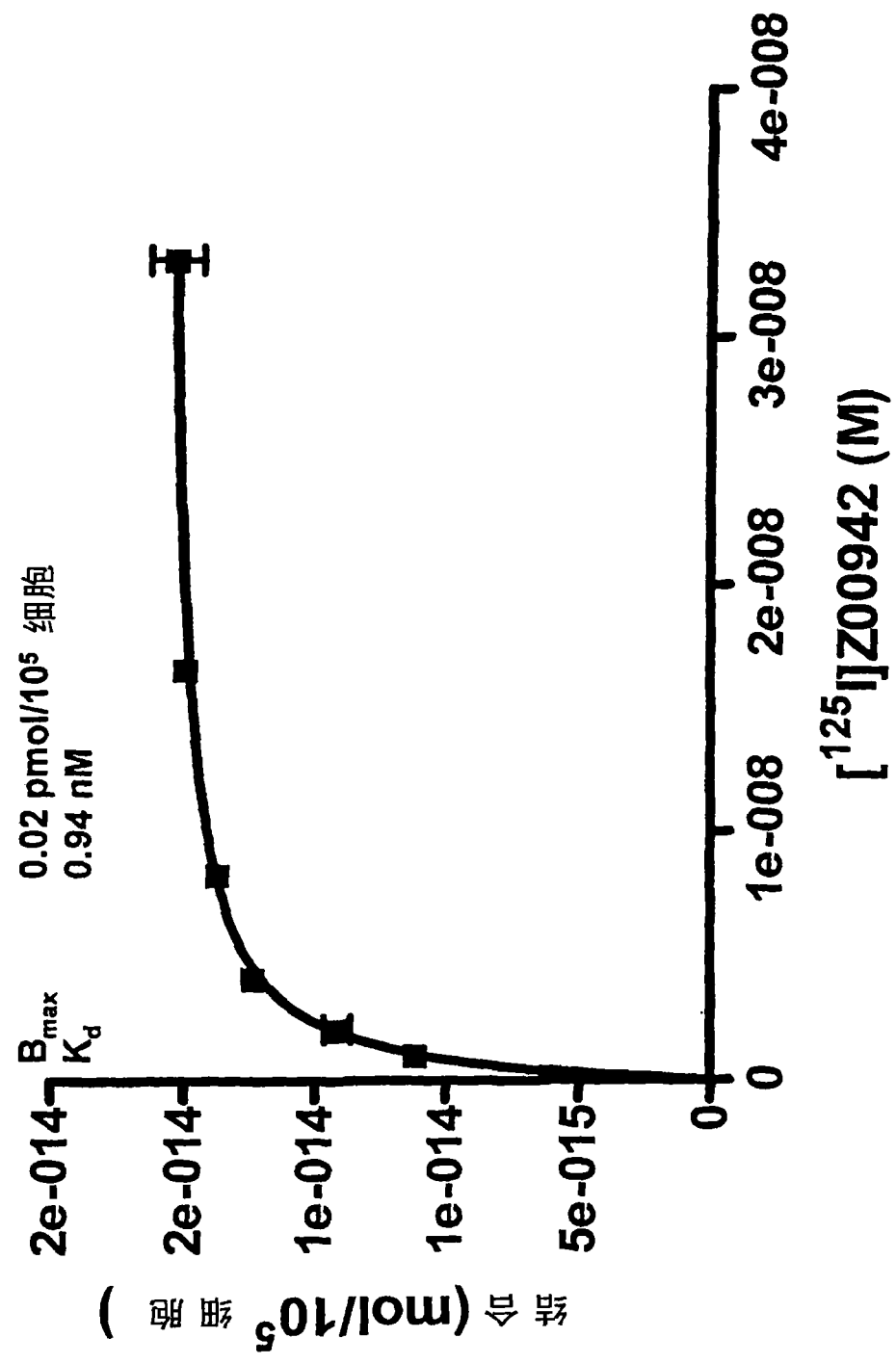


图8A

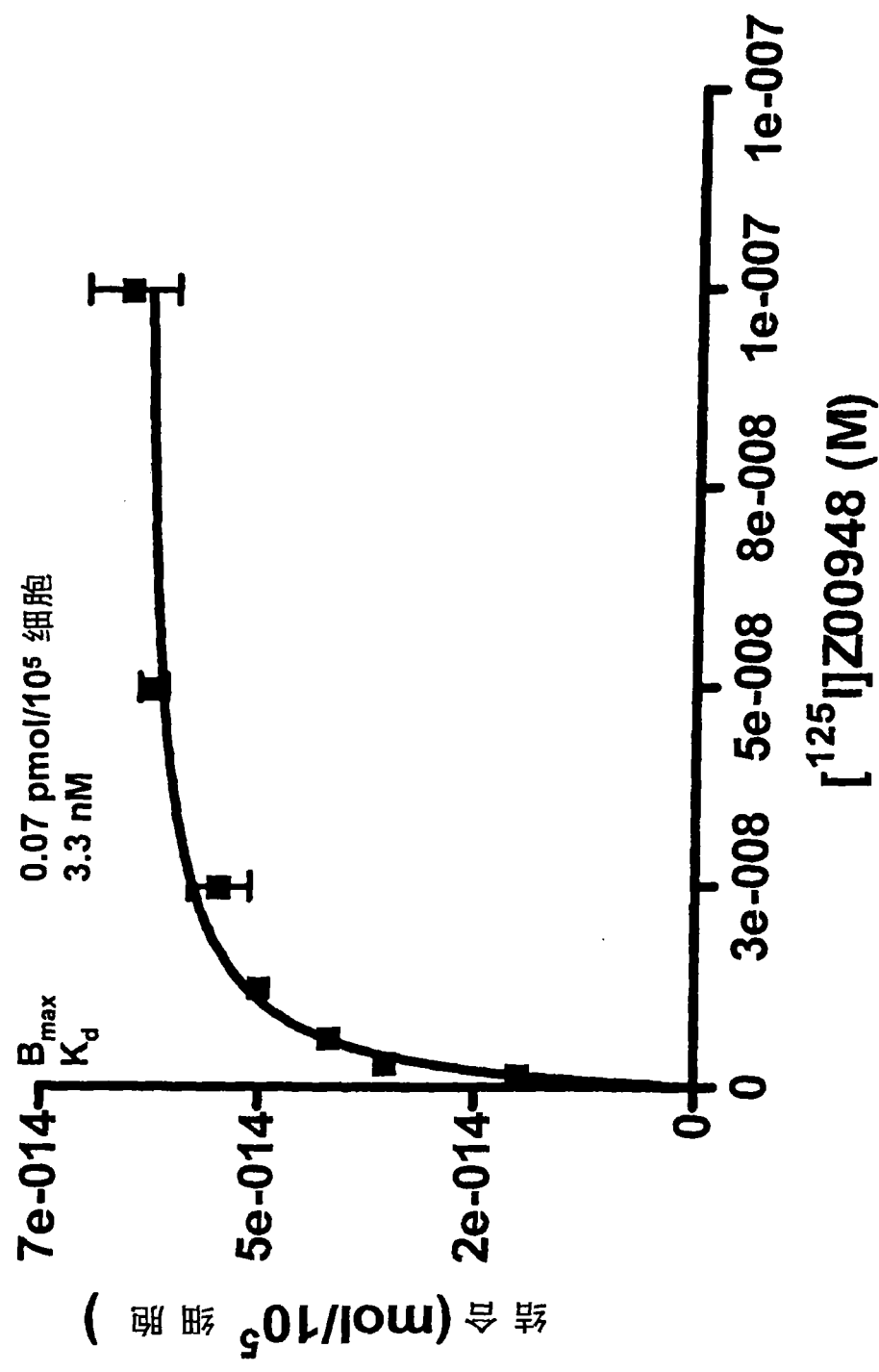


图8B

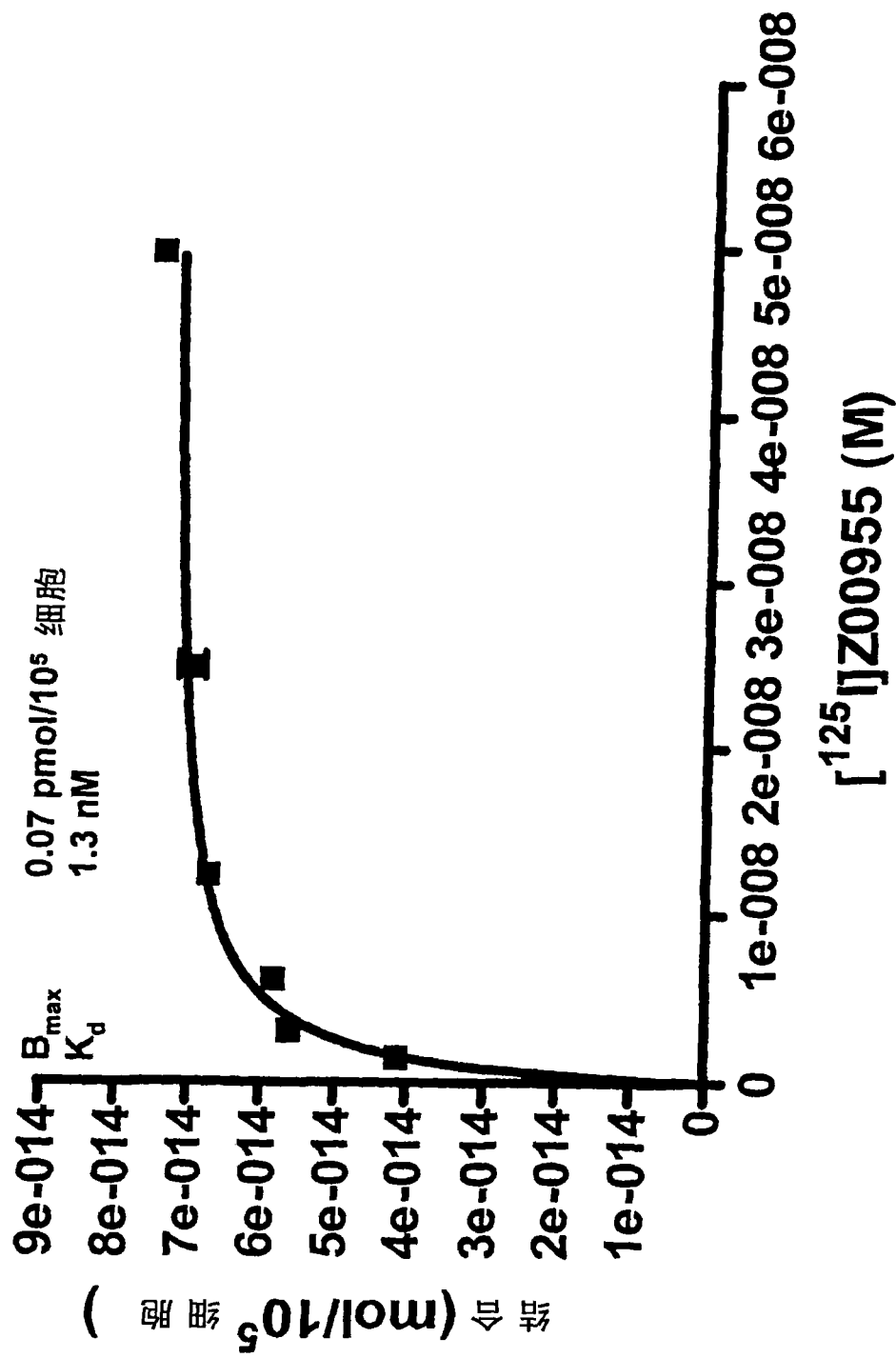
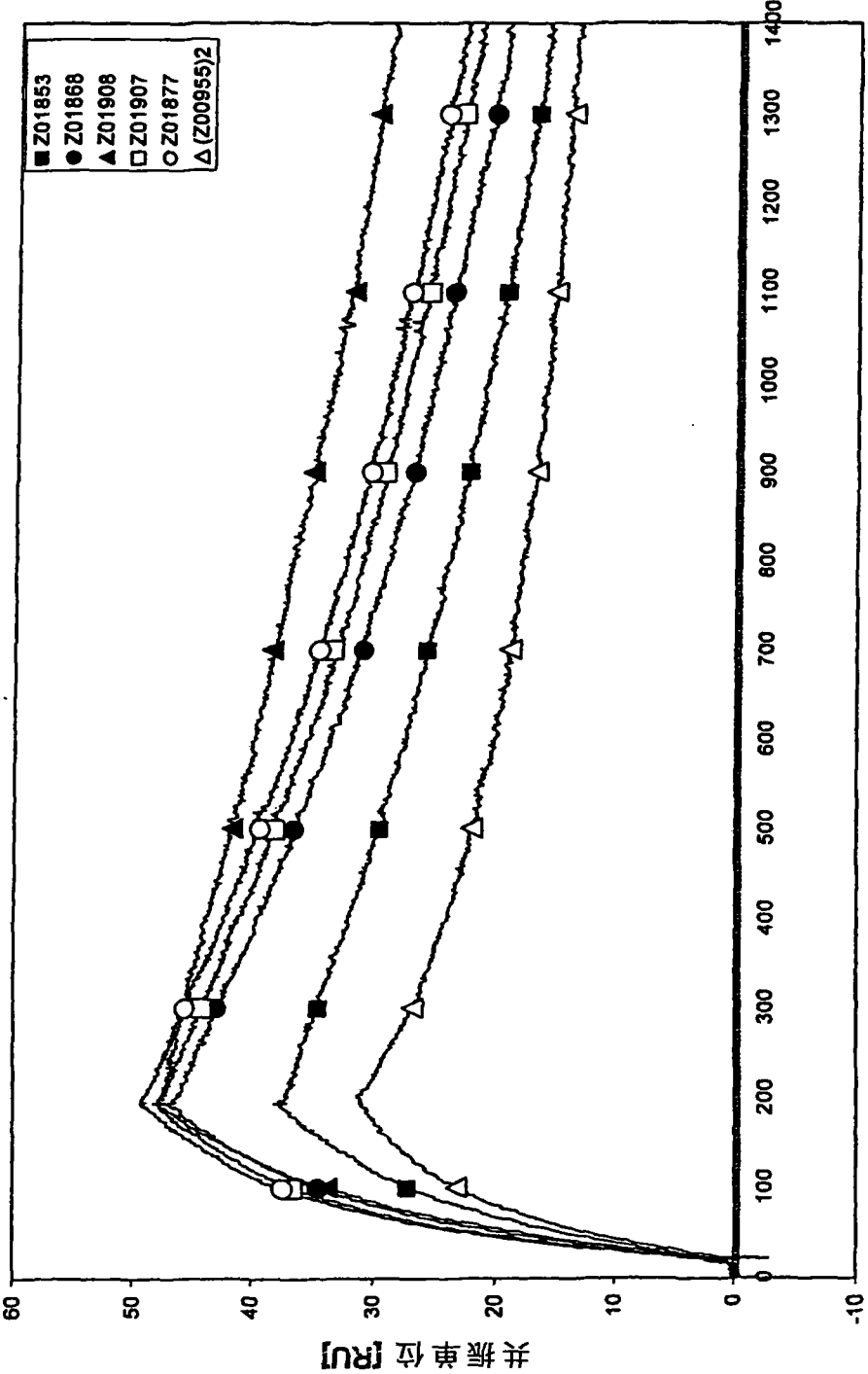
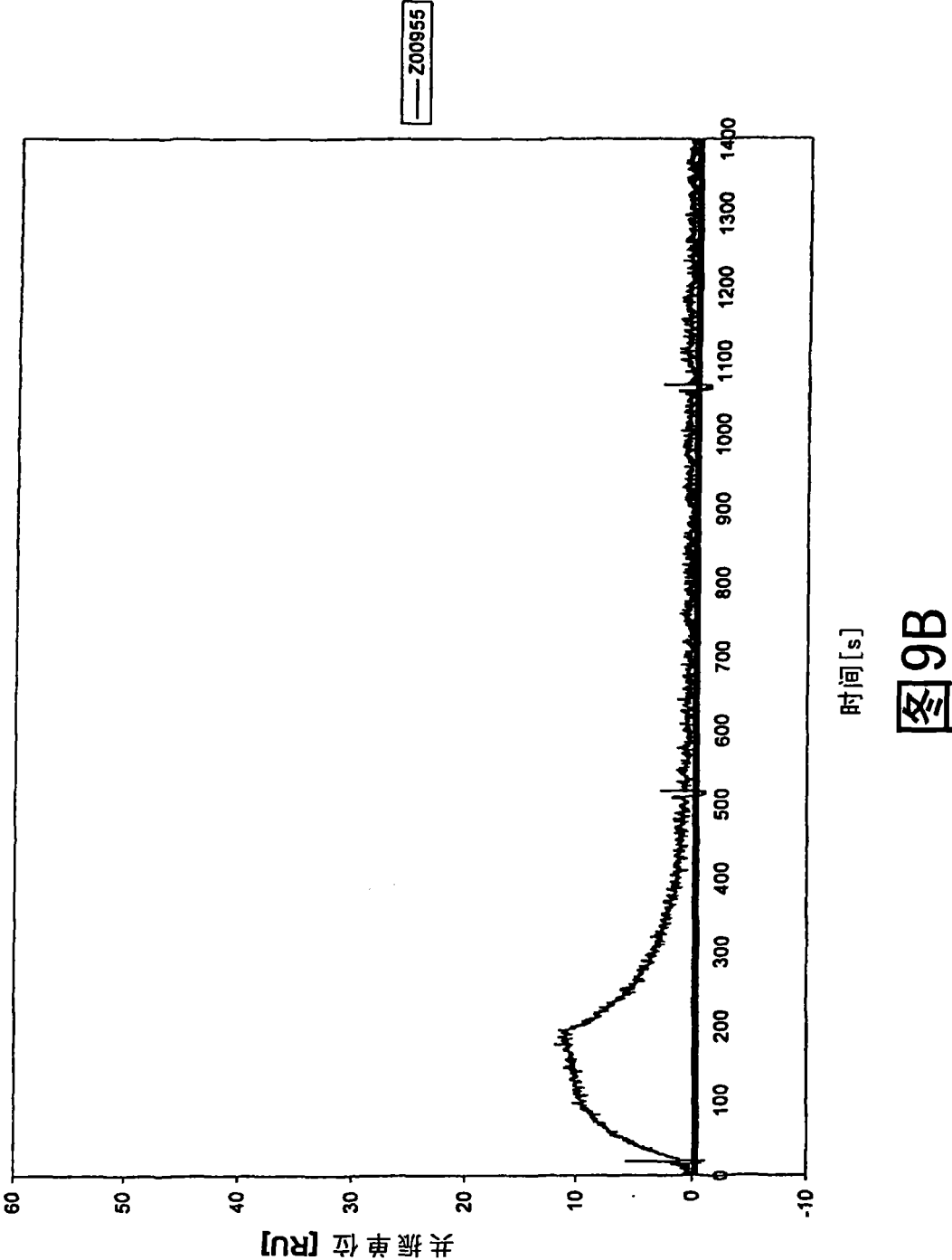


图8C



时间[s]

图9A



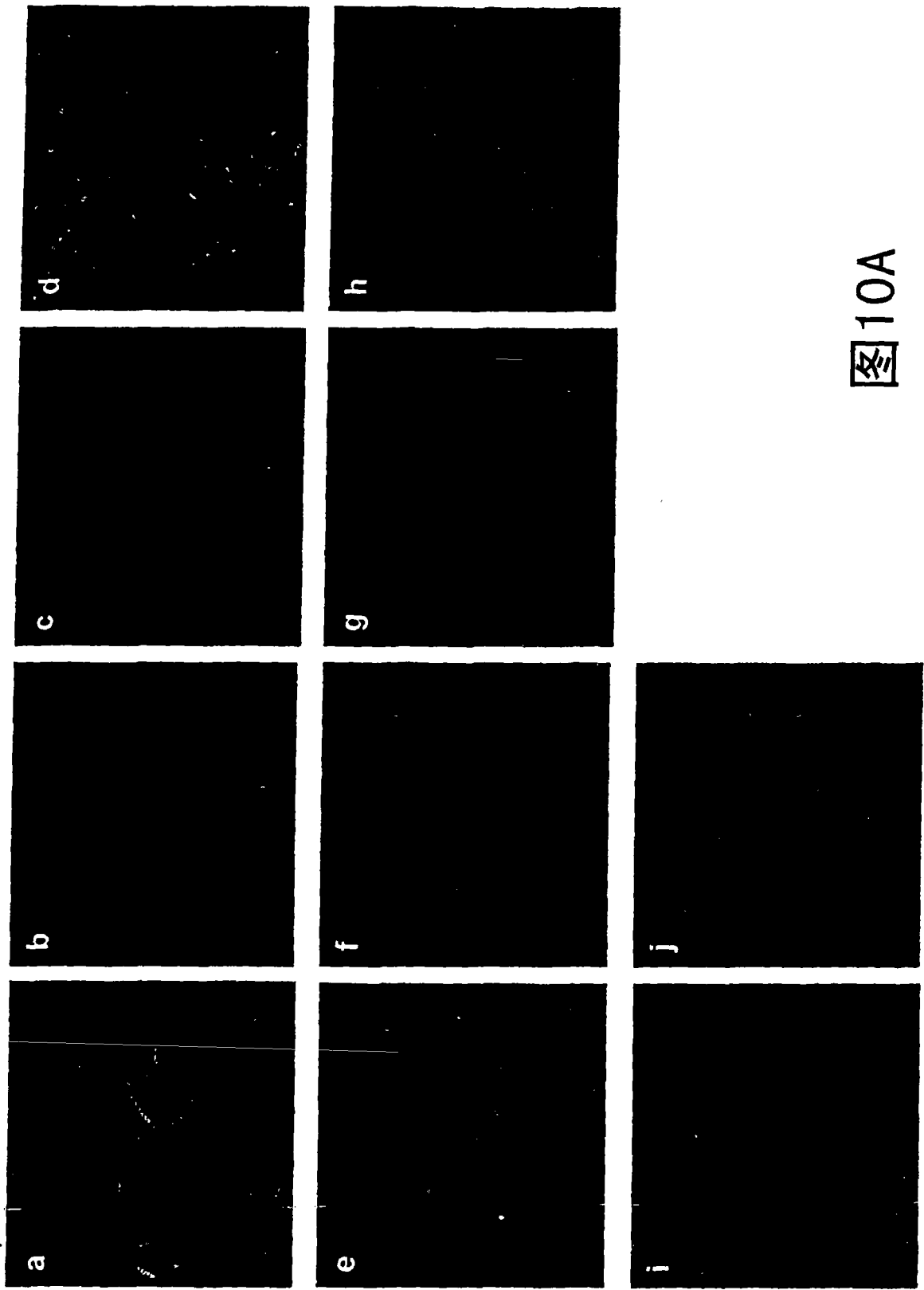


图 10A

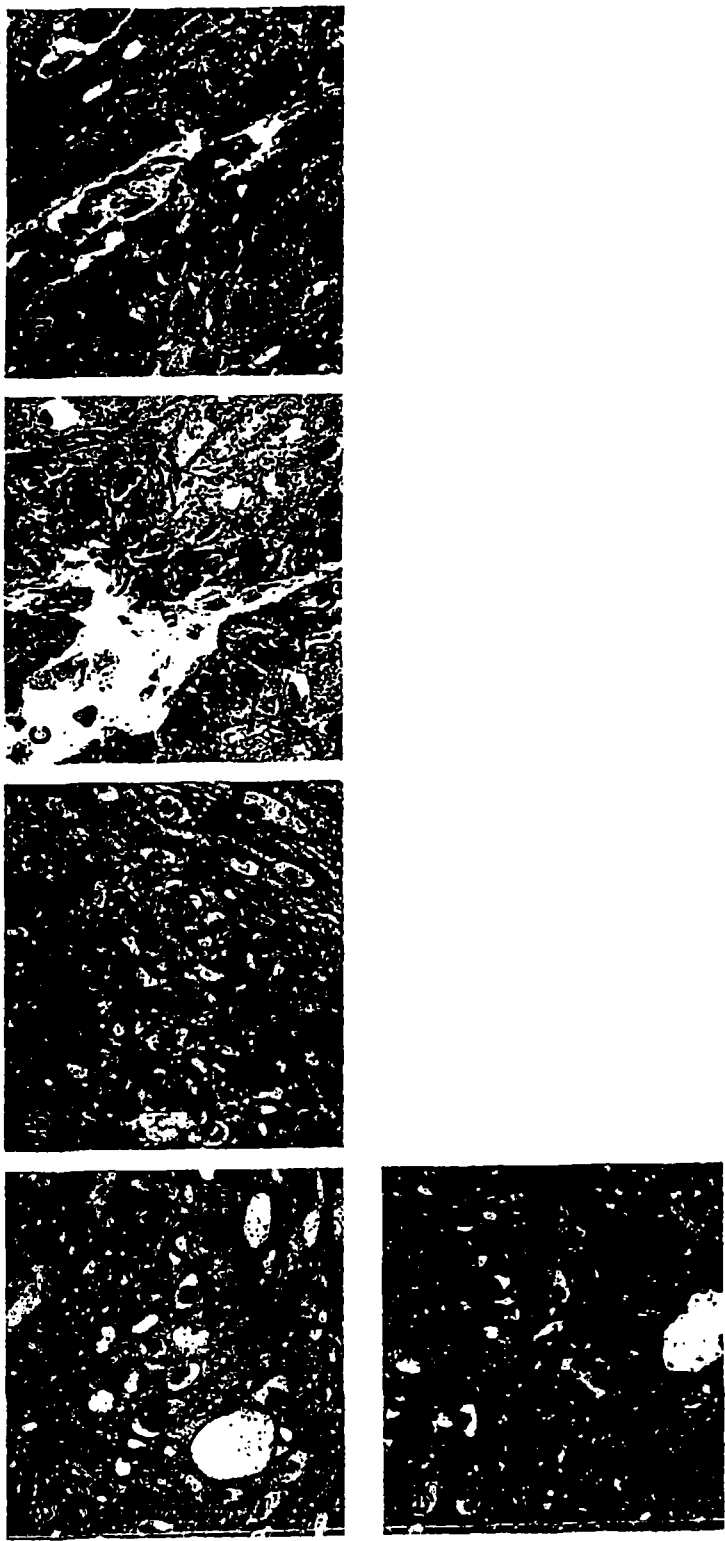


图10B

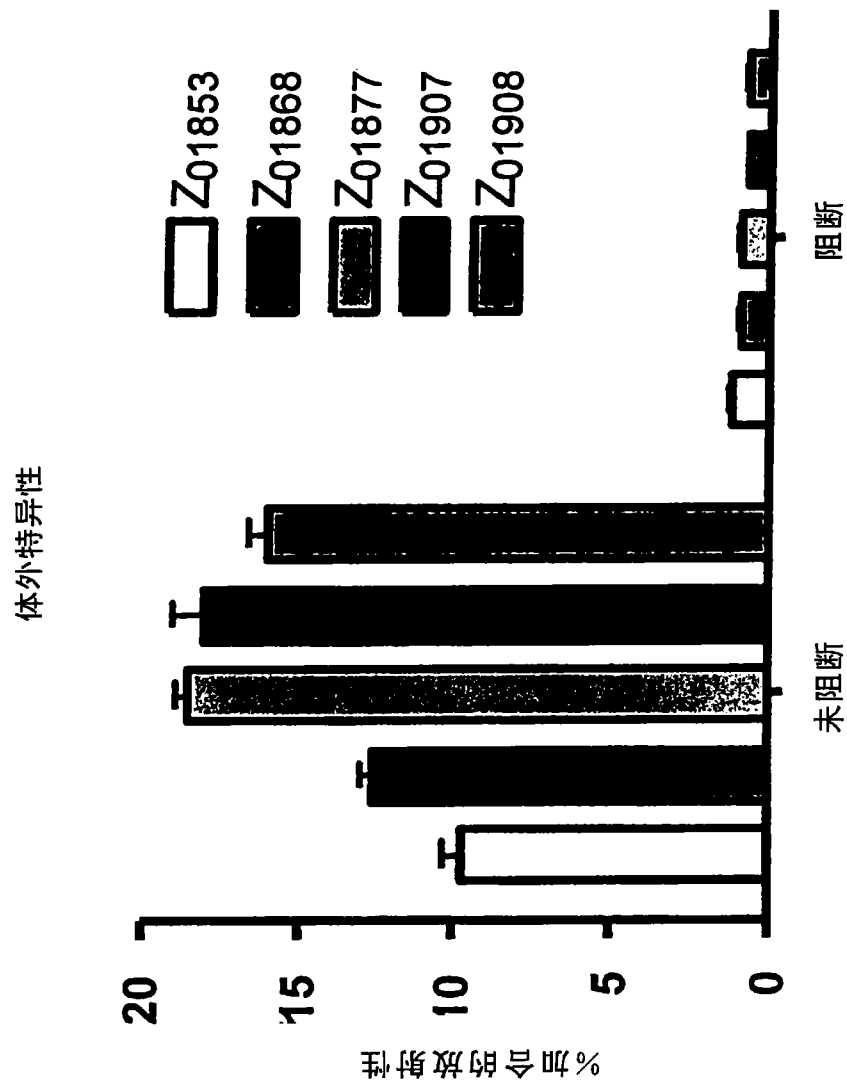


图11



图12