

DOI: 10.13376/j.cblls/2022009

文章编号: 1004-0374(2022)01-0083-08

· 技术与应用 ·

纳米抗体在肿瘤分子影像诊断中的研究进展

陈 曲¹, 杨晓梅², 施 维², 谢深霞^{3*}, 江梦捷⁴, 孙树阳¹, 卢小玲^{1*}

(1 广西医科大学口腔医学院, 广西纳米抗体研究重点实验室, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021; 2 广西医科大学基础医学院, 广西纳米抗体研究重点实验室, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021; 3 广西医科大学药学院药学实验中心, 广西纳米抗体研究重点实验室, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021; 4 广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021)

摘 要: 肿瘤的分子影像诊断是以肿瘤关键分子作为识别靶点, 借助特异性分子探针和高灵敏成像设备, 在活体状态下对肿瘤进行成像的技术。在临床实践中因其具备可定性、定量、可视化的优点, 近年来已经成为肿瘤早期诊断、肿瘤术前治疗的重要依据, 在疗效监测中起到不可或缺的作用。作为可结合肿瘤特异性靶标的分子探针的重要载体, 纳米抗体 (nanobody, Nb) 因具备体积小、稳定性强、亲和力高、免疫原性弱等显著优势, 在肿瘤分子影像诊断领域中的作用日渐突出。该文就纳米抗体的结构特征、基于纳米抗体的分子探针及其在分子影像应用领域的最新进展进行综述, 同时也讨论了纳米抗体应用于肿瘤成像的临床局限性, 并对其未来的研究应用进行了展望。

关键词: 纳米抗体; 单克隆抗体; 分子影像诊断; 肿瘤靶向

中图分类号: R445; R730.51 **文献标志码:** A

Progress of molecular imaging of nanobody in the diagnosis of cancers

CHEN Qu¹, YANG Xiao-Mei², SHI Wei², XIE Shen-Xia^{3*}, JIANG Meng-Jie⁴, SUN Shu-Yang¹, LU Xiao-Ling^{1*}

(1 International Nanobody Research Center of Guangxi, Key Laboratory for Nanobody Research of Guangxi, Stomatology College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2 International Nanobody Research Center of Guangxi, Key Laboratory for Nanobody Research of Guangxi, Basic Medical College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3 International Nanobody Research Center of Guangxi, Key Laboratory for Nanobody Research of Guangxi, Pharmacy Experimental Center, Pharmacy College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4 Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: Tumor molecular imaging diagnosis is a technology that uses specific molecular probes and highly sensitive imaging equipment to image tumors in a living status, through recognizing key tumor targets. In clinical practice, tumor molecular imaging provides important evidence for early diagnosis and preoperative treatment of tumors, and plays an indispensable role in treatment effectiveness monitoring in recent years, because of its qualitative, quantitative and visual advantages. As an important carrier of molecular probes that can bind to tumor-specific targets, nanobody (Nb) has greatest strengths in the field of tumor molecular imaging diagnosis due to its small size, strong stability, high affinity, and weak immunogenicity. Therefore, Nb plays an increasingly prominent role in the field of tumor molecular imaging diagnosis. This article reviews the structural characteristics of Nb, as well as the Nb-based molecular probes and their most recent advances in molecular imaging applications. Meanwhile, this article also discusses the clinical limitations of Nb for tumor imaging, and prospects some future research applications.

Key words: nanobody (Nb); monoclonal antibody (mAb); molecular imaging diagnosis; tumor targeting

收稿日期: 2021-06-22; 修回日期: 2021-10-12

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFE0117300); 广西科技基地和人才专项(桂科 AD20238062); 广西壮族自治区“八桂”学者科研团队(2016A07)

*通信作者: E-mail: luwuliu@163.com (卢小玲); xieshenxia@gxmu.edu.com (谢深霞)

肿瘤的早期发现和诊断是进行精准抗肿瘤治疗的关键,对于提高患者的生存率至关重要。分子影像(molecular imaging)是通过运用影像学手段在活体状态下对组织水平、细胞水平和亚细胞水平的生物过程进行可视化、表征和测量的一种具有医学应用价值的成像技术,对疾病尤其是肿瘤的早期诊断以及治疗评估具有重要意义^[1-2]。相比传统影像学,分子影像可在细胞和分子水平进行肿瘤早期筛查和诊断,具有高灵敏度及特异性等特点,在提高疾病的临床精确诊断和靶向治疗中发挥重要的作用^[3]。肿瘤成像领域中常用的分子影像技术包括正电子发射断层扫描(PET)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、磁共振成像(MRI)、超声造影(US)、光学成像等^[4](图1)。分子影像技术在肿瘤成像中的应用是以肿瘤关键分子作为识别靶点,借助特异性分子探针和高灵敏成像设备,在活体状态下对肿瘤进行成像。成像示踪剂的发展促进了成像技术的进步,而研发可与肿瘤靶向分子结合并能产生影像学信号的分子探针是当前肿瘤分子影像技术的重要研究方向。目前临床上常用的分子探针是与生物素、荧光素、放射性核素等物质偶联的抗体、寡聚核苷酸、多肽等^[5]。其中,因抗体具有识别和结合特异性抗原的生物学特性,其作为分子成像的介导体近年来已经得到普遍的发展和临床应用^[6]。

单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)因其特异性结合抗原的能力,长期以来一直被认为是分子成像示踪剂设计的主要抗体之一^[7]。然而,由于



图1 分子影像技术的类型

mAb的分子量和体积较大,难以通过体内多种生理屏障,在肿瘤内聚集缓慢,血液滞留时间较长,导致非特异性背景信号增高,影响了肿瘤和正常组织之间的对比度,从而限制了其在临床的应用^[8]。随着抗体工程技术的快速发展,一些小型化基因工程抗体片段已用于分子探针的开发,如抗原结合片段(antigen-binding fragment, Fab)和含有生物识别区域但缺乏恒定组分的单链可变区(single chain fragment variable, ScFv)^[9](图2)。这些抗体片段分子量在25~110 kDa之间,保留了完整mAb的靶向特性,且生产更经济^[10]。但是它们也存在着诸多问题,比如结合性弱、稳定性低、原掩盖的免疫原性表位被暴露等^[11]。纳米抗体是一种由骆驼源的重链可变区组成的单域抗体,与常规抗体相比,纳米抗体在组织中的穿透率更高,并且能够通过肾脏被快速清除。以纳米抗体为载体的分子探针可应用于在体肿瘤成像,是肿瘤分子探针开发研究的新方向^[12]。本文总结了纳米抗体的基本情况及其在肿瘤分子成像中的应用和挑战,以期为该领域的研究提供帮助。

1 纳米抗体的概念及特性

纳米抗体(nanobody, Nb)又称为单域抗体(single-domain antibody, sdAb),是一种新生代小型抗体,其源于骆驼重链抗体的单域可变区(VHH)^[13]。自从1993年Hamers-Casterman教授首次发现纳米抗体以来,其作为生物技术和医学领域中的多功能结合分子,受到了越来越多的关注^[14-15]。传统的抗体由4条肽链组成,包括2条重链(heavy chain)和2条轻链(light chain),并通过二硫键结合在一起。其中,轻链和重链分别由可变区(分别称为VL和VH)和恒定区(分别称为CL和CH)组成。可变区中的部分氨基酸易发生突变,称为互补决定区(complementarity-determining region, CDR),由其组成的抗原结合片段位于抗体两臂的末端。而CH又分为CH1、CH2和CH3,其中CH3主要涉及细胞膜表面受体结合;CH2涉及补体激活途径,是补体结合位点^[16]。

相较于传统的抗体,纳米抗体只包含了一个重链可变区(VHH)和两个常规的CH2与CH3区,因此也称为重链单域抗体(VHH)^[17]。相比于全长的mAb(~150 kDa)、Fab(~50 kDa)和scFv(~30 kDa),纳米抗体的分子量更小(仅有~15 kDa),其尺寸在纳米范围(长度为4 nm,直径仅为2.5 nm),大约由120个氨基酸组成。这种小分子抗体是目前可以得到的具有完整功能并且可以结合抗原的最小单元^[18-19]。

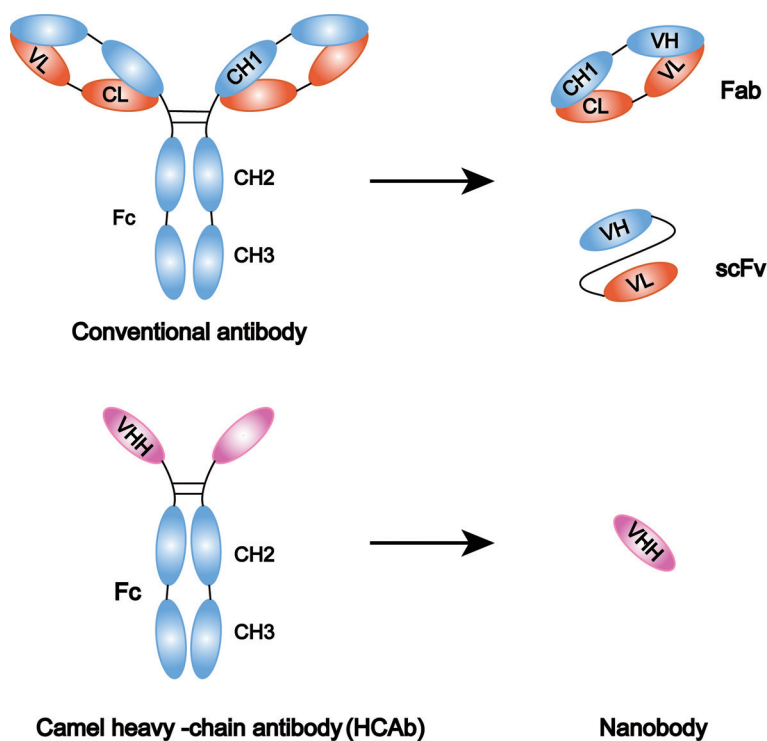


图2 抗体及抗体片段结构示意图

纳米抗体具有许多常规抗体所不具备的独特优势: (1) 纳米抗体体积小, 并且具有倾向于与凹形表位(例如酶的催化位点)结合的特性, 因此纳米抗体有更强的组织穿透能力, 并能识别常规抗体难以接近靶向的目标表面上的沟、缝或被隐藏的抗原表位^[20]; (2) VHH与常规的VH相比, 有更长的互补决定区3(CDR3), 这种长CDR3结构易形成凸环结构, 可以结合到抗原分子隐蔽的抗原表位, 因此弥补了纳米抗体由于轻链缺失而导致的抗原结合能力下降^[21]; (3) 纳米抗体易在细菌、酵母、真菌等微生物系统中进行体外原核/真核细胞的表达扩增, 从而能够以较低的成本进行大量生产^[22]; (4) 由于肾的滤过作用, 纳米抗体在血液中的半衰期短, 能够在肿瘤中迅速积累, 未结合部分会快速清除, 从而大大提高了肿瘤诊断的灵敏度和特异性^[23]; (5) 编码骆驼来源的纳米抗体的基因与人类3型VH结构域(VH3)具有高度的同源性, 因此它在人体内免疫原性较弱^[24](图3); (6) 纳米抗体仅包含一个结构域, 这种结构提高了纳米抗体的稳定性, 使其更适于作为无创的分子成像试剂和诊断工具^[25]。

临床上理想的示踪剂应在体内稳定, 能够扩散到组织深处而不会黏附到非靶向的细胞上, 以高亲和力和特异性与生物标志物相互作用, 同时未结合

的多余的示踪剂迅速从体内清除掉, 能在非侵入性体内成像中获得良好的对比度, 易于被染料或放射性核素标记, 成本低且无毒^[26]。与基于传统抗体的探针相比, 小分子量的纳米抗体应用在分子成像领域更有优势。因其能够均匀分布在肿瘤内, 具备较强的组织渗透力以及快速代谢的特性, 因此在给药后数小时内可获得高对比度图像, 更有助于对疾病进行评估。而且, 纳米抗体可以与放射性核素、荧光染料等多种显像剂偶联为新的成像探针, 并显示出较好的靶向性和理想的成像质量(图4)。同时, 纳米抗体的高特异性使其使用更加安全^[27]。总之, 纳米抗体完全满足作为分子成像的理想探针分子的必要条件, 作为一种新型的分子探针, 在单光子发射计算机断层显像(single photon emission computed tomography, SPECT)、正电子发射断层显像(positron emission tomography, PET)、光学、超声等不同类型的肿瘤靶向诊断分子影像技术方面展现出良好的应用前景。

2 纳米抗体在肿瘤分子影像中的应用现状

2.1 纳米抗体在核医学影像中的应用

SPECT与PET是最为常用的核医学分子成像技术, 均具有全身、半定量、实时和高灵敏性等内

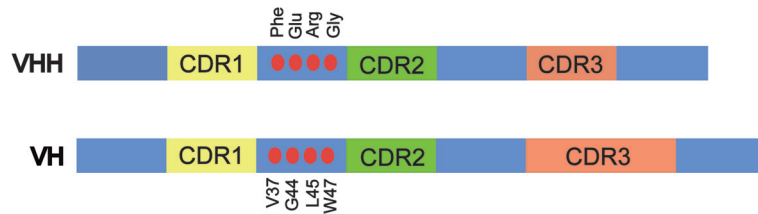


图3 VHH与VH的结构示意图

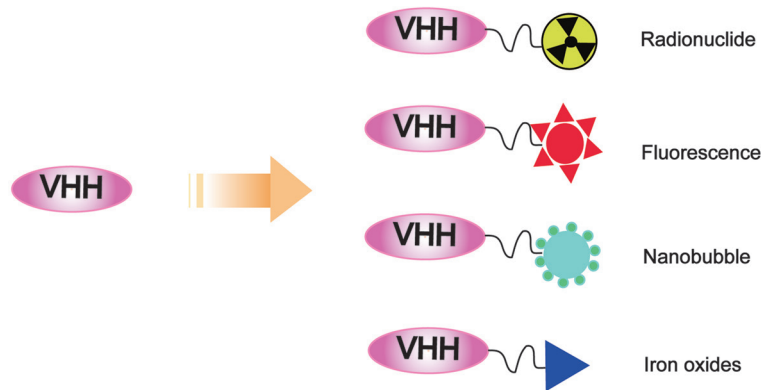


图4 基于纳米抗体的分子靶向探针

在优势,是临床上对肿瘤精准诊断和治疗的重要手段之一^[28]。SPECT成像是一种基于 γ 射线进行显影的技术,其抗体被共轭到放射性核素上(如 ^{99m}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 和 ^{177}Lu);这些 γ 射线由专用 γ 照相机或SPECT仪器的探测器进行记录,可以通过信号处理将其转换为图像,以查明放射性标记抗体的定位。而PET成像则需要用合适的发射正电子的放射性核素(例如 ^{18}F 、 ^{68}Ga 、 ^{124}I 、 ^{89}Zr)进行放射性标记^[29]。纳米抗体与放射性核素结合可以特异性地将放射性核素输送到肿瘤和(或)小转移灶,更适合在早期时间点获得高对比度的图像^[30]。例如,Piramoorn等^[31]用 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^{3+}$ 标记抗EGFR纳米抗体(OA-cb6),对其进行SPECT成像。在注射OA-cb6纳米抗体后4h可以看到肿瘤的位置,说明肿瘤可以特异性地摄取OA-cb6纳米抗体。此外,OA-cb6纳米抗体血液清除率快,肾脏摄取高,是一种很有前途的放射性标记生物分子,可用于过表达EGFR的肿瘤成像。

核素标记的纳米抗体靶向探针已经在临床前进行了大量的研究,目前也已进入临床试验。例如,靶向乳腺癌抗原HER2的纳米抗体探针已成功通过了I期临床试验。通过采用 ^{68}Ga 偶联抗HER2的纳米抗体分子探针(Nb 2Rs15d)作为成像剂,在20名原发或转移性乳腺癌患者体内进行PET/CT显像,

结果发现成像剂在HER2阳性转移灶中的积累明显高于癌旁组织,其辐射剂量为0.043 mSv/MBq,与其他常规使用的PET示踪剂相当,且无不良反应^[32]。目前,该示踪剂的II期临床研究正在进行中,将进一步评估该分子探针的靶向能力。2019年,Xing等^[33]使用 ^{99m}Tc 标记的抗PD-L1纳米抗体(NM-01)进行了早期I期临床研究,通过将纳米抗体NM-01用 $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ 络合物标记到其C-末端His标签上,进而评估16名非小细胞肺癌患者的PD-L1表达;结果表明,给药2h后,SPECT的肿瘤/血流比从1.24增加到3.53,证实了该成像示踪剂的安全性。总而言之,高效的肿瘤靶向性、快速的探针清除率以及低背景信号等特点,使纳米抗体在显像结果中有较高的肿瘤-正常组织信号比,因此纳米抗体在核素成像中具有广阔的应用前景。基于纳米抗体核素成像的研究还有很多,表1总结了核素标记纳米抗体示踪剂在临床前评估或临床转化中的研究现状。

2.2 纳米抗体在光学成像的应用

光学成像技术由于其经济、高效、安全、灵活、灵敏等优点在近年来发展迅速,是分子影像技术的重要组成部分。近红外荧光团标记的纳米抗体能够快速靶向、聚集到肿瘤部位,并从肾脏快速排泄。纳米抗体的这些特性显著提高了荧光探针在肿瘤中

表1 基于纳米抗体的核素成像在临床或临床前进展

靶标	纳米抗体	成像模式	疾病	研究阶段	参考文献
EGFR	OA-cb6	SPECT (^{99m}Tc)	皮肤鳞状细胞癌	临床前	[31]
	D10	SPECT (^{99m}Tc)	乳腺癌、A431	临床前	[34]
	7C12、7D12	SPECT (^{99m}Tc)	皮肤鳞状细胞癌	临床前	[35]
PSMA	JVZ-007	SPECT (^{111}In)	前列腺癌	临床前	[36]
HER2	2Rs15d	PET (^{68}Ga)	乳腺癌	临床 I / II 期(NCT03331601)	[32]
	2Rs15d	PET (^{18}F)	乳腺癌	临床前	[37]
PD-L1	NM-01	SPECT (^{99m}Tc)	非小细胞肺癌	临床 I 期(NCT02978196)	[33]

的特异性积累, 增强了成像对比度^[38]。例如, Lwin 等^[39] 将近红外荧光 IRDye800CW 与抗 CEA 的纳米抗体结合, 在静脉注射数小时后的不同时间点对小鼠进行成像。结果显示, CEA-Nb-800 在注射后 15 min 内快速成功地标记了表达 CEA 的 BxPC-3 胰腺癌, 而对照组没有观察到肿瘤特异性信号, 说明 CEA-Nb-800 对 CEA 表达的肿瘤具有特异性。同样, 纳米抗体分子探针也可用于(浸润前期)乳腺癌的快速成像。将靶向碳酸酐酶 IX (CAIX) 的纳米抗体偶联在 IRDye800-CW 上, 对乳腺浸润前癌(导管原位癌, DCIS) 进行显像评估, 发现在静脉输注 2 h 后即可观察到该荧光探针在 DCIS 肿瘤中有较高的摄取率^[40]。此外, 基于纳米抗体的荧光引导癌症手术为外科医生提供了实时、可视化、精确定位和特异性的肿瘤识别方案, 并有效地帮助他们在术中发现转移瘤和隐匿的肿瘤细胞, 从而帮助外科医生更彻底地切除肿瘤, 在很大程度上改善患者的预后^[41]。2020 年, Hu 等^[42] 报道了首例在 ICG 引导下的可见和 NIR- I / II 窗口下的人肝肿瘤手术, 该手术采用了多光谱荧光成像技术。这一结果进一步推动了基于纳米抗体的 NIR- II 探针在靶向肿瘤荧光成像中的发展。

2.3 纳米抗体在超声介导成像的应用

超声成像是一种无创、实时、安全且低成本的医疗诊断技术, 基于超声波根据器官或组织的不同而反射不同的原理被广泛应用于临床^[43]。目前, 直径约 1~8 μm 的微气泡 (micro bubbles, MBs) 被广泛用作超声造影剂。根据 MBs 卓越的散射特性以及对超声场的动态响应特性, 通过在体内局部产生回声改变, 从而提高成像的对比度, 以此来评估疾病的进展^[44]。然而, 由于颗粒大小的限制, MBs 不能穿透血管到达组织间隙, 因此不能靶向肿瘤细胞或进行肿瘤特异性成像, 从而影响了成像效果。近年来, 基于纳米抗体的新型分子超声造影剂已开发

成功, 并且在体内和体外实验中均得到证实, 基于纳米抗体的分子超声造影剂能够透过血管壁到达组织间隙, 进一步提高了微泡对肿瘤的靶向性及特异结合能力, 并且可有效监测体内肿瘤组织分子或细胞水平的变化, 从而提高恶性肿瘤诊断的准确性^[45]。例如, Hernot 等^[46] 成功将血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 特异性 Nb 与脂质 MBs 偶联, 在高表达 VCAM-1 的 MC38 结肠癌异种移植模型小鼠体内进行超声成像, 结果显示 VCAM-1 靶向的 MBs 在 MC38 肿瘤血管系统中的黏附率显著高于非 VCAM-1 靶向的 MBs。Fan 等^[47] 将靶向抗前列腺特异性膜抗原 (prostate-specific membrane antigen, PSMA) 的纳米抗体与超声纳米气泡进行耦合, 并评估了它们的体外结合能力和体内成像效果; 结果显示, 靶向纳米气泡能够与前列腺癌细胞进行特异性结合, 从而提高体内异种移植肿瘤信号水平。Yu 等^[48] 通过将抗 G250 纳米抗体与脂质纳米泡偶联形成 anti-G250 NTN, 并验证其对肾细胞癌 (RCC) 的特异靶向性; 结果显示, 抗 G250 纳米抗体功能化靶向纳米泡可以特异性增强裸鼠中肾细胞癌的超声成像, 从而区分良性和恶性肾脏肿块。以上研究表明, 以纳米抗体为基础的超声微泡可以提高对早期疾病的诊断能力, 获得高质量及高特异性的影像。

2.4 纳米抗体在多模态分子成像的应用

除了各种单模态成像技术外, 纳米抗体因其独特的优势, 还可以作为多种成像探针的理想靶向剂, 实现多模态成像。磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 是一种利用强磁场产生更高分辨率图像的成像技术, 除了具备较高的软组织和空间分辨力之外, 还有组织对比度优异、组织穿透性强、无电离辐射和无侵入性等优点。例如, Prantner 等^[49] 通过将生物素化的抗间皮素纳米抗体 G3a (NbG3a) 连接到荧光标记的链霉亲和素或链霉亲和素标记的

铁氧化物上,使用MRI成像和荧光成像来检测人和小鼠体内间皮素的表达。结果证实,NbG3a作为分子探针可早期监测高表达间皮素的肿瘤,有望实

现临床转化。因此,多模态成像可以提供更多的肿瘤检测和诊断信息,弥补了临床单一成像方式的不足(表2)。

表2 纳米抗体分子探针在其他分子成像中的应用实例

靶标	纳米抗体	成像模式	疾病	研究阶段	参考文献
CEA	α -CEA	荧光成像	胰腺癌	临床前	[39]
CAIX	α -CAIX	荧光成像	乳腺浸润前癌	临床前	[40]
VCAM-1	α -VCAM-1	超声微泡	结肠癌	临床前	[45]
PSMA	α -PSMA	超声微泡	前列腺癌	临床前	[46]
G250	α -G250	超声微泡	肾细胞癌	临床前	[47]
间皮素	NbG3a	荧光/MRI	卵巢癌	临床前	[48]

3 纳米抗体用于肿瘤成像诊断的问题和挑战

作为一种新生代小型化抗体,纳米抗体自发现以来,经过许多学者不断地筛选、优化和重构,已广泛应用于生物学各领域的研究。尽管纳米抗体有着诸多优点,但也存在着一些有待解决的问题。一方面,纳米抗体因其分子量和体积小,在血液中快速从肾脏和肝脏排泄,可导致肾脏和膀胱内高信号,容易降低病变检出的敏感性^[50]。基于此,可以利用聚乙二醇化、纳米材料等与其进行结合,从而延长纳米抗体在体内的半衰期。另一方面,纳米抗体在与成像标记物(例如荧光团)偶联时,纳米抗体的结合并不稳定,其性能可能会发生改变^[51],因此,还需要进一步的研究来改善和克服,提高纳米抗体与标记物结合后的稳定性。新的纳米抗体诊断探针的研制是一个不断探索的过程,在制备工艺的优化方面还需要进行不断的探索。虽然存在着一些局限性,但迄今为止利用纳米抗体进行分子成像仍然取得了令人兴奋的结果,这表明纳米抗体示踪剂在未来的临床实践中将有广阔的应用前景。

4 前景和展望

分子影像作为肿瘤诊断的重要技术,在肿瘤学研究中发挥着巨大的作用。纳米抗体作为一种新型的肿瘤靶向工具展现出了独特的优势,在临床前和临床模型中都显示出巨大的分子成像潜力,正逐渐成为新一代肿瘤临床诊断技术的重要工具。基于纳米抗体的分子探针在许多方面都优于传统抗体,在极端条件下稳定性好,通用于从宏观到微观的纳米生物学研究,并提高了注射示踪剂后在不同时间段内对不同肿瘤进行高对比度成像的可能性,从

而有利于为每个患者选择合适的靶向性治疗。目前有大量的临床前研究表明了纳米抗体作为分子成像示踪剂的潜力,同时,一些基于纳米抗体的示踪剂也已经进入了临床试验,为人类疾病的诊断提供了一种新型的诊断工具。综上所述,纳米抗体的发现和应用,不仅为肿瘤的早期检测提供了新的方向 and 选择,同时也推动了分子影像学的不断进步。相信在不久的将来,随着纳米抗体制备工艺的不断完善,以纳米抗体为核心的新型分子探针将会有更广泛的应用,不仅能对肿瘤进行早期诊断、精准分期、精确定位,甚至还能够对肿瘤进行靶向治疗,从而实现“诊治一体化”。

[参 考 文 献]

- [1] Mankoff DA. A definition of molecular imaging. *J Nucl Med*, 2007, 48: 18N, 21N
- [2] 张美欣,刘特立,郭晓轶. 单域抗体在肿瘤分子影像学中的研究进展. *肿瘤防治研究*, 2019, 46: 262-5
- [3] 王培军,沈爱军. 分子影像学探针的研究现状与展望. *中国医学影像技术*, 2017, 33: 1445-6
- [4] Erreni M, Schorn T, D'Autilia F, et al. Nanobodies as versatile tool for multiscale imaging modalities. *Biomolecules*, 2020, 10: 1695
- [5] Jin Y, Liu B, Younis MH, et al. Next-generation molecular imaging of thyroid cancer. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 3188
- [6] Xenaki KT, Oliveira S, van Bergen En Henegouwen PMP. Antibody or antibody fragments: implications for molecular imaging and targeted therapy of solid tumors. *Front Immunol*, 2017, 8: 1287
- [7] Zheng F, Sparkes A, de Baetselier P, et al. Molecular imaging with kupffer cell-targeting nanobodies for diagnosis and prognosis in mouse models of liver pathogenesis. *Mol Imaging Biol*, 2017, 19: 49-58
- [8] Mir MA, Mehraj U, Sheikh BA, et al. Nanobodies: the "magic bullets" in therapeutics, drug delivery and

- diagnostics. *Hum Antibodies*, 2020, 28: 29-51
- [9] Salvador JP, Vilaplana L, Marco MP. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411: 1703-13
- [10] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1126-36
- [11] Rosenfeld L, Sananes A, Zur Y, et al. Nanobodies targeting prostate-specific membrane antigen for the imaging and therapy of prostate cancer. *J Med Chem*, 2020, 63: 7601-15
- [12] Bannas P, Lenz A, Kunick V, et al. Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: timing and dosage are crucial factors for improved *in vivo* detection. *Contrast Media Mol Imaging*, 2015, 10: 367-78
- [13] Arezumand R, Alibakhshi A, Ranjbari J, et al. Nanobodies as novel agents for targeting angiogenesis in solid cancers. *Front Immunol*, 2017, 8: 1746
- [14] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363: 446-8
- [15] Chames P, Rothbauer U. Special issue: nanobody. *Antibodies*, 2020, 9: 6
- [16] Iezzi ME, Policastro L, Werbach S, et al. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment. *Front Immunol*, 2018, 9: 273
- [17] Sun S, Ding Z, Yang X, et al. Nanobody: a small antibody with big implications for tumor therapeutic strategy. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 2337-56
- [18] Yang EY, Shah K. Nanobodies: next generation of cancer diagnostics and therapeutics. *Front Oncol*, 2020, 10: 1182
- [19] Li C, Tang Z, Hu Z, et al. Natural single-domain antibody-nanobody: a novel concept in the antibody field. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14: 1-19
- [20] Allegra A, Innao V, Gerace D, et al. Nanobodies and cancer: current status and new perspectives. *Cancer Invest*, 2018, 36: 221-37
- [21] Chanier T, Chames P. Nanobody engineering: toward next generation immunotherapies and immunoimaging of cancer. *Antibodies*, 2019, 8: 13
- [22] Liu W, Song H, Chen Q, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol Immunol*, 2018, 96: 37-47
- [23] Bao G, Tang M, Zhao J, et al. Nanobody: a promising toolkit for molecular imaging and disease therapy. *EJNMMI Res*, 2021, 11: 6
- [24] van Audenhove I, Gettemans J. Nanobodies as versatile tools to understand, diagnose, visualize and treat cancer. *EBioMedicine*, 2016, 8: 40-8
- [25] Singh P, Gao F, Bernat A. Nanobodies and their *in vivo* applications [M]//Inamuddin, Khan R, Mohammad A, et al. *Advanced biosensors for health care applications*. Amsterdam: Elsevier, 2019: 263-77
- [26] Muyldermans S. A guide to: generation and design of nanobodies. *FEBS J*, 2021, 288: 2084-102
- [27] Debie P, Devoogdt N, Hernot S. Targeted nanobody-based molecular tracers for nuclear imaging and image-guided surgery. *Antibodies (Basel)*, 2019, 8: 12
- [28] Velikyian I. Molecular imaging and radiotherapy: theranostics for personalized patient management. *Theranostics*, 2012, 2: 424-6
- [29] Al-Baradie RS. Nanobodies as versatile tools: a focus on targeted tumor therapy, tumor imaging and diagnostics. *Hum Antibodies*, 2020, 28: 259-72
- [30] Krasniqi A, D'Huyvetter M, Devoogdt N, et al. Same-day imaging using small proteins: clinical experience and translational prospects in oncology. *J Nucl Med*, 2018, 59: 885-91
- [31] Piramoon M, Hosseinimehr SJ, Omidfar K, et al. ^{99m}Tc-anti-epidermal growth factor receptor nanobody for tumor imaging. *Chem Biol Drug Des*, 2017, 89: 498-504
- [32] Keyaerts M, Xavier C, Heemskerk J, et al. Phase I study of ⁶⁸Ga HER2-nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma. *J Nucl Med*, 2016, 57: 27-33
- [33] Xing Y, Chand G, Liu C, et al. Early phase I study of a ^{99m}Tc-labeled anti-programmed death ligand-1 (PD-L1) single-domain antibody in SPECT/CT assessment of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *J Nucl Med*, 2019, 60: 1213-20
- [34] Krüwel T, Nevoltris D, Bode J, et al. *In vivo* detection of small tumour lesions by multi-pinhole SPECT applying a ^{99m}Tc-labelled nanobody targeting the epidermal growth factor receptor. *Sci Rep*, 2016, 6: 21834
- [35] Gainkam LO, Huang L, Caveliers V, et al. Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two ^{99m}Tc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT. *J Nucl Med*, 2008, 49: 788-95
- [36] Chatalic KL, Veldhoven-Zweistra J, Bolkestein M, et al. A novel ¹¹¹In-labeled anti-prostate-specific membrane antigen nanobody for targeted SPECT/CT imaging of prostate cancer. *J Nucl Med*, 2015, 56: 1094-99
- [37] Zhou Z, Vaidyanathan G, McDougald D, et al. Fluorine-18 labeling of the Her2-targeting single-domain antibody 2Rs15d using a residualizing label and preclinical evaluation. *Mol Imaging Biol*, 2017, 19: 867-77
- [38] Liu M, Li L, Jin D, et al. Nanobody--a versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, 13: e1697
- [39] Lwin TM, Hernot S, Hollandsworth H, et al. Tumor-specific near-infrared nanobody probe rapidly labels tumors in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Surgery*, 2020, 168: 85-91
- [40] van Brussel AS, Adams A, Oliveira S, et al. Hypoxia-targeting fluorescent nanobodies for optical molecular imaging of pre-invasive breast cancer. *Mol Imaging Biol*, 2016, 18: 535-544
- [41] Debie P, Vanhoeij M, Poortmans N, et al. Improved debulking of peritoneal tumor implants by near-infrared fluorescent nanobody image guidance in an experimental mouse model. *Mol Imaging Biol*, 2018, 20: 361-7
- [42] Hu Z, Fang C, Li B, et al. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared-I/II windows. *Nat Biomed*

- Eng, 2020, 4: 259-71
- [43] Abou-Elkacem L, Bachawal SV, Willmann JK. Ultrasound molecular imaging: moving towards clinical translation. *other*, 2015, 84: 1685-93
- [44] Zhang H, Ingham ES, Gagnon MK, et al. *In vitro* characterization and *in vivo* ultrasound molecular imaging of nucleolin-targeted microbubbles. *Biomaterials*, 2017, 118: 63-73
- [45] Zhang J, Chen Y, Deng C, et al. The optimized fabrication of a novel nanobubble for tumor imaging. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 610
- [46] Hernot S, Unnikrishnan S, Du Z, et al. Nanobody-coupled microbubbles as novel molecular tracer. *J Control Release*, 2012, 158: 346-53
- [47] Fan X, Wang L, Guo Y, et al. Ultrasonic nanobubbles carrying anti-PSMA nanobody: construction and application in prostate cancer-targeted imaging. *PLoS One*, 2015, 10: e0127419
- [48] Yu Z, Hu M, Li Z, et al. Anti-G250 nanobody-functionalized nanobubbles targeting renal cell carcinoma cells for ultrasound molecular imaging. *Nanotechnology*, 2020, 31: 205101
- [49] Prantner AM, Yin C, Kamat K, et al. Molecular imaging of mesothelin-expressing ovarian cancer with a human and mouse cross-reactive nanobody. *Mol Pharm*, 2018, 15: 1403-11
- [50] Bedford R, Tiede C, Hughes R, et al. Alternative reagents to antibodies in imaging applications. *Biophys Rev*, 2017, 9: 299-308
- [51] Hu Y, Liu C, Muyldermans S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy. *Front Immunol*, 2017, 8: 1442