

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

单域抗体在肿瘤分子影像学中的研究进展

张美欣, 刘特立, 郭晓轶, 徐晓霞, 朱华, 杨志

引用本文:

张美欣, 刘特立, 郭晓轶, 等. 单域抗体在肿瘤分子影像学中的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(03): 262-265.

ZHANG Meixin, LIU Teli, GUO Xiaoyi, et al. Progress of Single-domain Antibodies in Molecular Imaging of Tumors[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2019, 46(03): 262-265.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.0473>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌治疗中面临的问题

Challenges of Immune Checkpoint Inhibitors in Treatment of Non-small Cell Lung Cancer

肿瘤防治研究. 2019, 46(06): 556-560 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1563>

靶向HER2阳性肿瘤的PET/CT分子显像临床研究进展

Progress in PET/CT Molecular Imaging Targeting HER2-positive Tumour

肿瘤防治研究. 2019, 46(04): 376-381 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1016>

以间皮素为靶点的肿瘤特异性核素成像研究进展

Progress in Mesothelin as Target for Cancer Specific Radionuclide Imaging

肿瘤防治研究. 2018, 45(9): 691-694 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0087>

PD1/PD-L1激活促进癌症发生、发展和转移的研究进展

Novel Findings on Activation of PD1/PD-L1 that Contributes to Cancer Development and Metastasis

肿瘤防治研究. 2017, 44(6): 423-427 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0087>

靶向FGFR4的抗肿瘤药物研究进展

Research Progress of FGFR4 Targeted Anti-tumor Drug

肿瘤防治研究. 2017, 44(1): 61-65 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.01.013>



杂志官网



微信公众号

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.0473

• 综述 •

单域抗体在肿瘤分子影像学中的研究进展

张美欣^{1,2}, 刘特立¹, 郭晓轶¹, 徐晓霞¹, 朱华¹, 杨志¹

Progress of Single-domain Antibodies in Molecular Imaging of Tumors

ZHANG Meixin^{1,2}, LIU Teli¹, GUO Xiaoyi¹, XU Xiaoxia¹, ZHU Hua¹, YANG Zhi¹

1. Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of Nuclear Medicine, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China; 2. School of Basic Medical Science, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Corresponding Author: ZHU Hua, E-mail: zhuhuananjing@163.com

Abstract: A single-domain antibody (sdAb) is the variable region extracted from antibodies with only heavy chains found in camelid serum. Single-domain antibodies have the characteristics of easy expression, good solubility, great stability and weak immunogenicity. Since single-domain antibodies have higher penetration in tissues than conventional antibodies and can be cleared by the kidneys quickly, they are ideally suited for various biotechnologies and clinical treatment of tumors. The monovalent sdAb could be coupled to radioisotopes, fluorescent dyes, biotin, magnetic beads, affinity matrices and so on. A complex molecular-conjugated sdAb can be used for *in vivo* multiple modes tumor imaging. In the basic research, development of probe and other fields, single-domain antibody has a broad prospect in application. This review summarizes the molecular features and the applications in tumor molecular imaging of single-domain antibodies.

Key words: Monoclonal antibody; Single-domain antibody; Molecular imaging; Tumor targeting

摘要: 单域抗体 (single-domain antibody, sdAb) 是一种从骆驼科动物血清中提取的仅具有重链的抗体的可变区。单域抗体具有易表达、水溶性好、稳定性强、免疫原性弱等特点。与常规抗体相比,单域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,使其能被理想地应用于各种生物技术和肿瘤临床治疗。单价sdAbs可以与放射性同位素、荧光染料、生物素、磁珠、亲和基质等化学物质偶联形成复合型分子偶联的sdAbs,可用于多种模式的在体肿瘤成像,在基础研究、探针开发等领域有着广阔的应用前景。本文就单域抗体的分子特征和其在肿瘤分子影像学中的应用进行综述。

关键词: 单克隆抗体; 单域抗体; 分子影像; 肿瘤靶向

中图分类号: R730.54; R730.44

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

分子影像 (molecular imaging) 是近年来发展迅速并且极具医学应用价值的用于显示细胞和亚细胞水平的特定靶向分子的成像技术。分子影像技术较经典影像技术例如CT、经典MRI、X射线而言,具有较高的敏感度和特异性,并且涉及分子生物学、化学、光学、放射医学、计算机科学等多个领域,临床应用范围广,潜在的研究价值高。目前,分子影像学包括光学成像、PET/SPECT成像、超声造影技

术等。分子成像的发展依赖于分子探针的开发,分子探针可以与靶向分子结合并能产生影像学信号,从而被示踪的分子。目前常见的分子探针包括与放射性核素、生物素、顺磁性粒子、荧光素等物质化学偶联的多肽、单克隆抗体、寡聚核苷酸等。寻找和研发敏感度更高、特异性更强、信噪比更高的分子探针是科研人员持续关注的话题。本文总结了一类可以作为分子探针开发方向的抗体——单域抗体 (single-domain antibody, sdAb) 的基本情况及其在分子成像中的应用,以期为该领域的研究提供帮助。

1 单域抗体的基本情况

1.1 单域抗体的分子结构

传统抗体的基本结构是由四条多肽链组成的“Y”型蛋白质。这四条多肽链包括两条完全相同的重链和两条完全相同的轻链,彼此通过二硫键

收稿日期: 2018-04-10; 修回日期: 2018-08-20

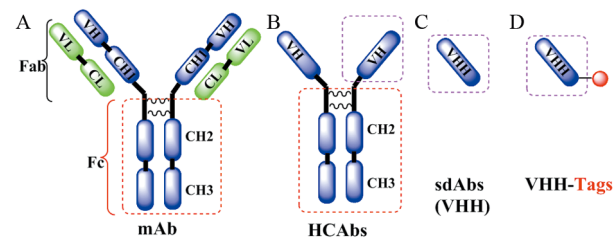
基金项目: 国家自然科学基金 (81401467, 81731592)

作者单位: 1. 100142 北京, 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所, 核医学科, 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室; 2. 100191 北京, 北京大学医学部基础医学院

通信作者: 朱华, E-mail: zhuhuananjing@163.com

作者简介: 张美欣 (1996-), 女, 本科在读, 主要从事分子影像技术, PET/CT新型分子探针的研究

连接，由此形成了异型四聚体（heterotetramer）。传统抗体的重链和轻链由可变区（分别称为VH和VL）和恒定区（分别称为CH和CL）组成，见图1。



A: Schematic diagram of monoclonal antibody (mAb); B: Schematic diagram of HCAs. There is no difference between Fc fragment from HCAs and that from mAb, but HCAs lacks the CH1 region and its VH region is slightly heavier than the corresponding region of mAb; C: sdAbs (VHH), the heavy chain variable region of HCAs; D: sdAb (VHH) conjugated with radioisotopes, fluorescent dyes, biotin, magnetic bead and affinity matrix, etc.

图1 抗体结构示意图

Figure1 Schematic diagram of antibodies

1993年，Hamers-Casterman教授^[1]在分析单峰骆驼血清中的免疫球蛋白G分子（IgG）时，偶然发现了除了常规的IgG1（MW~150 kDa）之外，还有两种其他结构的免疫球蛋白组分IgG2和IgG3（MW~90 kDa）存在，IgG2和IgG3为缺乏轻链、仅含有重链的抗体（heavy-chain antibodies, HCAs），为重链的同型二聚体（homo-dimeric heavy-chain），其占有血清IgG的75%。1995年，Greenberg等^[2]研究发现了护士鲨（nurse shark）体内存在大量HCAs，证实了HCAs的存在。感染了伊氏锥虫的骆驼的抗体通过放射免疫沉淀和印迹实验^[3]显示出IgG2和IgG3的重链部分具有强结合活性。

目前普遍认为HCAs和传统抗体相比具有如下分子及结构特征。首先，重链的同型二聚体缺少轻链及第一个恒定区，VH直接通过铰链区与抗体Fc段结合。HCAs缺乏CH1区，可能是由CH1区外显子和内含子边界存在的非剪接位点上的点突变所导致^[3-4]。其次，VH的FR2中有4位疏水性氨基酸被亲水性氨基酸所取代，即Val42→Phe/Tyr、Gly49→Glu、Leu50→Arg/Cys和Trp52→Gly/Phe^[5-6]。这些疏水性氨基酸向亲水性氨基酸的突变是HCAs的重链不与轻链配对的原因之一，也阻止了单域抗体（从HCAs中提取出来的重链可变区），也称单域重链抗体（variable domain of the heavy-chain antibody, VHH）的聚合。此外，VHH与异型四聚体的VH相比，有更长的CDR3，VHH的CDR3大致由16~24个氨基酸组成^[7]，有些单域抗体的CDR3甚至超过25个氨基酸^[8]，而传统单抗的CDR3仅有7~12个氨基酸。这种长CDR3结构形成的凸环可以结合

到抗原分子的隐蔽的抗原表位，弥补了单域抗体缺少轻链导致的抗原结合能力下降^[7]。最后一点区别是，单峰驼VHH种系基因编码CDR1中的Cys残基，而在所有VH种系基因（包括单峰驼的那些基因）中都不存在这些位置的Cys残基。此外，VHH的CDR3中的第二个Cys仅在VHH-D-JH基因的重组过程中被引入。这些额外的Cys残基形成额外的环间二硫键，以稳定较长的CDR3^[9]。

1.2 单域抗体的生物学特性

对基因组和cDNA文库进行基因的同源性分析，发现骆驼VHH基因与人类Ⅲ族VH3结构域的编码基因高度同源。因此，骆驼来源的单域抗体在人体中是弱免疫原性的^[10]。除了弱免疫原性外，单域抗体具有很好的高热稳定性和重折叠能力，甚至在暴露于极端条件下，如极低或高pH值和高温时也表现出高溶解度和重折叠能力。这种能力可能与疏水性氨基酸的突变有关^[11]。Ladenson等^[12]分离和鉴定了来自美洲驼的咖啡因特异性重链抗体片段（VHH），其中一个VHH片段（VSA2）表达为可溶性蛋白质，能够在70℃结合咖啡因，在暴露于高达90℃的温度后仍能恢复其反应性。

常规抗体渗透入实体瘤、穿过血脑屏障较困难，单域抗体与常规抗体相比，在组织中的穿透率更高，并且具有快速的血液清除率^[13]，因此能快速地到达肿瘤部位，使其能被理想地应用于各种生物技术和治疗。此外，sdAbs可以融合其他蛋白质或多肽，从而被克隆成各种组合形式。sdAb可以被串联克隆成具有不同特异性的sdAb，例如血清白蛋白，可协助sdAb靶向特定区域，或有助于增加试剂的体内半衰期，避免治疗过程中较高的药物清除率导致的高剂量给药和频繁给药^[14]。单价sdAbs可以与放射性同位素、荧光染料、生物素、磁珠、亲和基质等化学缀合。放射性标记的sdAbs可用于体内肿瘤成像^[15]，见图1。

2 单域抗体在分子影像中的应用

2.1 单域抗体在PET/SPECT中的应用

靶向分子成像探针一般为放射性标记的单克隆抗体（mAb）。单克隆抗体的主要缺点是它们在血液中的停留时间从几天到几周不等，在注射后2~4天，靶组织与周围组织之间才有放射性信号的峰值对比。因此需要使用长半衰期的放射性核素如⁸⁹Zr（ $t_{1/2}=78.4$ h）或¹²⁴I（ $t_{1/2}=100.3$ h）进行放射性标记^[16]。Menke-van der Houven van Oordt等^[17]报道了⁸⁹Zr标记的西妥昔单抗（属于嵌合型IgG1单克隆抗体，靶向EGFR）在晚期结直肠癌患者中的PET显像情况。结果显示，注射后的第6天为

显像的最佳时间点,因此,mAb的动力学过慢。相比之下,VHH片段能从血液中被快速清除,并且可以用短半衰期的放射性核素如 ^{68}Ga ($t_{1/2}=68\text{ min}$)、 ^{18}F ($t_{1/2}=110\text{ min}$)或 ^{64}Cu ($t_{1/2}=12.7\text{ h}$)等进行标记。

例如,Keyaerts等^[18]报道了 ^{68}Ga 标记的靶向HER2分子的单域抗体在乳腺癌患者体内的PET/CT显像。单域抗体具有快速代谢的特性,因此注射单域抗体后较早的时间点就可以进行成像,且注射后60~90 min显像效果达到最佳状态。其生物分布特征有利于通过分子影像技术检测肿瘤:其在肾、肝和肠中摄取最高,但在检测原发性乳腺癌或肿瘤转移时,其他器官的背景水平非常低^[18]。

Huang等^[15]研究的靶向EGFR的单域抗体8B6显示出对EGFR过表达细胞的高特异性和选择性结合。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -8B6通过SPECT分析,能够在体内检测出中高度EGFR过表达的肿瘤。同时,生物分布实验进一步证实了单域抗体对体内肿瘤成像的适用性。在肿瘤部位,定量聚集的核素标记的抗EGFR单域抗体有望监测表达EGFR的肿瘤治疗情况^[19]。

除了HER2和EGFR位点外,靶向CEA位点的单域抗体也被研究人员广泛开发并应用于分子影像。Vaneycken等^[20]用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记了靶向CEA位点的单域抗体NbCEA5和人源化CEA5抗体,并进行了SPECT显像。分析显示, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NbCEA5和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的人源化CEA5抗体注射后1小时,分别观察到较强的肿瘤摄取。总而言之,快速的探针清除,高效的肿瘤靶向与低背景信号等特点相结合,促成了NbCEA5和人源化CEA5抗体在显像结果中的高肿瘤-正常组织信号比。

2.2 单域抗体在光学影像中的应用

单域抗体也可以与合适的荧光团结合,用来进行肿瘤的光学成像^[21]。近红外(Near Infrared, NIR)荧光团的发展使这种成像方式具有高度的灵活性、敏感度、速度和成本效益^[18]。

van Brussel等^[22]开发了一种与近红外荧光团IRDye800CW偶联的碳酸酐酶9(carbonic anhydrase IX, CAIX,可被作为区分癌症与非癌性组织的标志物)特异性单域抗体,证明这种探针在手术前和手术过程中可应用于缺氧前侵袭性乳腺癌的光学分子成像。同时研究证实CAIX特异性常规抗体(MabCAIX)还能进行DCIS(导管原位癌)的光学成像,在注射后的24小时内,抗体的缓慢清除率导致了不理想的荧光信号对比,并且在探针给药后72小时才获得最佳的肿瘤-正常组织信号比;而在单域抗体探针给药后2小时就已经达到了肿瘤-正常组织的高对比度。使用单域抗体的主要

优点是可以获得更快的清除率和图像采集以及更高的对比度,这种药代动力学使探针注射和外科手术可以在同一天进行。

Oliveira等^[23]开发了一种抗EGFR单域抗体探针,并用于光学分子成像。作者将抗EGFR单域抗体7D12和西妥昔单抗分别与近红外荧光团IRDye800CW偶联。注射后30分钟,7D12-IR就可肿瘤显影,而在注射西妥昔单抗-IR的动物体内,在肿瘤部位没有观察到高于背景的信号。肿瘤中IR缀合蛋白的定量分析显示,在注射7D12-IR后2小时的肿瘤摄取,显著高于注射西妥昔单抗-IR后24小时肿瘤的摄取。这种差异与肿瘤内7D12-IR的优越渗透和分布有关。这些结果表明,与NIR荧光团结合的抗EGFR单域抗体具有优异的性能,在临床前快速光学成像和患者补充诊断中很有应用前景。

2.3 单域抗体在超声造影中的应用

虽然光学成像具有诸多优点,但同时也存在着劣势。研究人员旨在克服深部组织中由光散射造成的限制,但仍处于起步阶段。超声是一种安全、快速和廉价的被广泛使用的医疗诊断技术。最近,基于单域抗体的新型分子超声造影剂的开发已有报道,并在体外和体内实验中均得到证实^[24]。

超声成像越来越多地使用靶向微泡(MB)来评估疾病进展期间出现的血管内分子事件。MBs通常可以增强超声成像的对比度。Hernot等^[24]成功地将增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)特异性单域抗体(cAbGFP4)与偶联生物素的微泡MBs偶联,并证实了MB-cAbGFP4与eGFP的特异性结合,以及MB-cAbVCAM1-5在快速流动时结合血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)的能力。MB-cAbVCAM1-5在肿瘤血管中的结合不仅允许肿瘤状态的成像,而且可以进行靶向治疗。值得注意的是,当用对比特异性超声成像模式成像时,VCAM-1靶向的MBs在MC38肿瘤血管系统中的黏附显著高于非VCAM-1靶向的MBs。因此,共价连接到MB上的人源化单域抗体应该被考虑用于临床前开发评估,并且有望进入临床实践中。

3 展望

尽管单域抗体存在诸多优点,其开发利用也很具有前景,但是单域抗体也存在着一些劣势。单域抗体的分子量可达约15 kDa,直径和长度分别仅有约2.5 nm和4 nm。这种小分子特征有时对于改造和临床应用是不利的。例如,单域抗体与荧光团等成像标记物联合时,单域抗体的结合特性可能发生改变^[25]。此外,在某些情况下,观察到放射性标记单域抗体

在肾脏和肝脏中的摄取量较高,这不仅会对肝脏和肾脏产生不良结果,还限制了肝脏和肾脏附近的待测分子的检测灵敏度^[16,26-27]。并且单域抗体的快速清除阻碍了其于疾病部位的所有表位的最佳结合,导致疾病部位摄取量减少,也可能限制单域抗体进行免疫治疗的效果。尽管通过很多方法可以实现单域抗体半衰期的显著增加,但是因为单域抗体中不存在效应结构域,其在免疫治疗中的功效比传统抗体低得多^[28]。尽管不适用于治疗应用,基于单域抗体技术的下一代分子成像剂的开发仍然非常有前景。

此外,单域抗体的非人源特征可能使其在人体内引起抗单域抗体免疫应答。尽管单域抗体与VH III家族的人VH基因的大序列具有同一性和快速血液清除率,使其被认为具有低免疫原性^[16],但是单域抗体和VH仍有约10个不同的氨基酸,以确保不存在VL结构域时,单域抗体具有最大的溶解度和稳定性。若想实现临床多种手段相结合的长期治疗,需要进一步将单域抗体的氨基酸序列人源化^[29]。

4 小结

分子影像作为肿瘤诊断的重要技术以及肿瘤治疗领域具有广阔前景的学科,在肿瘤学研究中发挥着举足轻重的作用。研究人员当前正致力于开发更新型的有临床优势的探针。单域抗体以其稳定性强、免疫原性弱等诸多优势得到研究者的关注,随着单域抗体制备技术的优化和新生产工艺的出现,以单域抗体为核心的新型分子探针有望为肿瘤的诊疗提供全新的方法。

参考文献:

[1] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-8.

[2] Greenberg AS, Avila D, Hughes M, *et al.* A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks[J]. *Nature*, 1995, 374(6518): 168-73.

[3] Gonzalez-Sapienza G, Rossotti MA, Tabares-da Rosa S. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 977.

[4] Muyldermans S, Smider VV. Distinct antibody species: structural differences creating therapeutic opportunities[J]. *Curr Opin Immunol*, 2016, 40: 7-13.

[5] Arbabi-Ghahroudi M. Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1589.

[6] Schusser B, Collarini EJ, Pedersen D, *et al.* Expression of heavy chain-only antibodies can support B-cell development in light chain knockout chickens[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(9): 2137-48.

[7] Kazemi-Lomedasht F, Muyldermans S, Habibi-Anboui M, *et al.* Design of a humanized anti vascular endothelial growth factor nanobody and evaluation of its in vitro function[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(3): 260-6.

[8] Liu JL, Shriver-Lake LC, Anderson GP, *et al.* Selection, characterization, and thermal stabilization of llama single domain antibodies towards Ebola virus glycoprotein[J]. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 223.

[9] Tian B, Wong WY, Uger MD, *et al.* Development and Characterization of a Camelid Single Domain Antibody-Urease Conjugate That Targets Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 956.

[10] Smolarek D, Bertrand O, Czerwinski M. Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine?[J]. *Postępy Hig Med Dośw(Online)*, 2012, 66: 348-58.

[11] Fernandes CFC, Pereira SDS, Luiz MB, *et al.* Camelid single-domain antibodies as an alternative to overcome challenges related to the prevention, detection, and control of neglected tropical diseases[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 653.

[12] Ladenson RC, Crimmins DL, Landt Y, *et al.* Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(13): 4501-8.

[13] Klein Á, Kovács M, Muskotál A, *et al.* Nanobody-Displaying Flagellar Nanotubes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3584.

[14] Goldman ER, Broussard A, Anderson GP, *et al.* Bglbrick strategy for the construction of single domain antibody fusions[J]. *Heliyon*, 2017, 3(12): e00474.

[15] Huang L, Gankam LO, Cavelliers V, *et al.* SPECT imaging with ^{99m}Tc-labeled EGFR-specific nanobody for *in vivo* monitoring of EGFR expression[J]. *Mol Imaging Biol*, 2008, 10(3): 167-75.

[16] 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[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21834.

[17] Menke-van der Houven van Oordt CW, Gootjes EC, Huisman MC, *et al.* ⁸⁹Zr-cetuximab PET imaging in patients with advanced colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 30384-93.

[18] Keyaerts M, Xavier C, Heemskerck J, *et al.* Phase I study of ⁶⁸Ga-HER2-Nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma[J]. *J Nucl Med*, 2016, 57(1): 27-33.

[19] Kruziki MA, Case BA, Chan JY, *et al.* ⁶⁴Cu-labeled Gp2 Domain for PET Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor[J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(11): 3747-55.

[20] Vaneycken I, Govaert J, Vincke C, *et al.* *In vitro* analysis and *in vivo* tumor targeting of a humanized, grafted nanobody in mice using pinhole SPECT/micro-CT[J]. *J Nucl Med*, 2010, 51(7): 1099-106.

[21] Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: The “magic bullet” for molecular imaging?[J]. *Theranostics*, 2014, 4(4): 386-98.

[22] van Brussel AS, Adams A, Oliveira S, *et al.* Hypoxia-Targeting Fluorescent Nanobodies for Optical Molecular Imaging of Pre-Invasive Breast Cancer[J]. *Mol Imaging Biol*, 2016, 18(4): 535-44.

[23] Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Waisum M, *et al.* Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody[J]. *Mol Imaging*, 2012, 11(1): 33-46.

[24] Hernot S, Unnikrishnan S, Du Z, *et al.* Nanobody-coupled microbubbles as novel molecular tracer[J]. *J Control Release*, 2012, 158(2): 346-53.

[25] Hu Y, Liu C, Muyldermans S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1442.

[26] Bedford R, Tiede C, Hughes R, *et al.* Alternative reagents to antibodies in imaging applications[J]. *Biophys Rev*, 2017, 9(4): 299-308.

[27] Ding H, Gangalum PR, Galstyan A, *et al.* HER2-positive breast cancer targeting and treatment by a peptide-conjugated mini nanodrug[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(2): 631-9.

[28] Iezzi ME, Policastro L, Werbach S, *et al.* Single-Domain Antibodies and the Promise of Modular Targeting in Cancer Imaging and Treatment[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 273.

[29] Zheng F, Perlman H, Matthys P, *et al.* Specificity Evaluation and Disease Monitoring in Arthritis Imaging with Complement Receptor of the Ig superfamily targeting Nanobodies[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35966.

[编辑: 安凤; 校对: 刘红武]

作者贡献:

张美欣: 文献整理及撰写
刘特立、郭晓轶、徐晓霞、朱华、杨志: 指导论文的撰写