

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2020.6.1.39>

Radiolabeled single-domain antibody for tumor receptor imaging

Yeajin Moon, Ju Young Lee, Woonseok Ryoo, and Seung-Yong Seo*

College of Pharmacy and Gachon Institute of Pharmaceutical Sciences, Gachon University, Incheon, 21936, Republic of Korea

ABSTRACT

Recently, single-domain antibodies (sdAb) are bioengineered for molecular imaging applications. Single-domain antibody, obtained from naturally occurring antibodies in camelid species and cartilaginous fish is the smallest fully functional antigen-binding antibody fragments of heavy-chain. Since their discovery, they have been investigated extensively in clinical therapeutics, monitoring and diagnostics. Their small size is important advantage for high solubility, high stability, fast blood clearance and rapid targeting. This review article summarizes the recent status of this new antibody to visualize, diagnose or inhibit specific targets of cancer.

Key Word: single-domain antibody, camelid VHH, cancer, molecular imaging

Introduction

가장 가파르게 성장하고 있는 영역 중 하나로 분자영상의학은 중앙 조사, 임상시험 등에서 필수적이다(1). 현재는 CT, MRI, 초음파, 광음파 영상촬영 등이 사용되고 있는데 단일 영상 촬영장비는 여러 측면에 대한 정보를 제공할 수 없으므로 복수 영상촬영이 요구되고, 이로 인한 피사체 조사도 매우 높다(2). 또한 이 기법들은 프로브에 의해 전달되는 신호의 축적을 통해 이루어지는 비침습적 생체 내 영상기법으로서 생체 적합성, 독성 및 안정성, 조직에서 고 대비 신호 등을 만족하는 것이 주요 과제로 남아있다. 단일클론항체(mAb)는 오랫동안 항원에 대한 특수성을 갖기 때문에 진단에 사용되어 왔지만 큰 크기(150 kDa)에 의해 낮은 종양침투도, 면역반응 유도, 긴 반감기라는 한계를 갖고 있다(3). 따라서 생체 내 특성화와 다양한 생물학적 정량화를 위

해 정확성과 민감도가 더 높은 플랫폼이 요구되었고 이를 해결하기 위해 항원결합영역(Fab fragments), 가변영역(Fv fragments), 단일 사슬 가변영역(scFv fragments)이 사용되었다. 그러나 이 단백질들은 불안정하고 Ab에 비해 낮은 활성을 갖는다.(4)

Single-domain antibody (sdAb)에 해당하는 camelid의 중사슬 가변영역(VHH)은 앞서 언급한 대부분의 문제들을 해결할 수 있을 것으로 보인다(5). VHH는 작은 크기(15 kDa, 길이 4nm, 폭 2.5nm), 높은 용해도 및 안정성, 특이성, 친화도를 나타낼 뿐만 아니라 쉽게 생산할 수 있고 열 및 화학적 저항성을 갖는다 (Figure 1). VHH의 이런 성질들을 바탕으로 종양 진단 및 치료를 포함한 여러 분야에서 연구가 진행되고 있다 (6). 2019년 2월 Sanofi의 카블리비(Cablivi, caplacizumab)가 후천성 혈전성 혈소판감소성 자반증(aTTP) 첫 번째 sdAb 기반 치료제로서 FDA의 승인을

Received: June 15, 2020 / Revised: June 24, 2020 / Accepted: June 26, 2020

Corresponding Author : Seung-Yong Seo, College of Pharmacy, Gachon University, Incheon 21936, Republic of Korea, Tel:+82-32-820-4949, E-mail: syseo@gachon.ac.kr

Copyright©2020 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

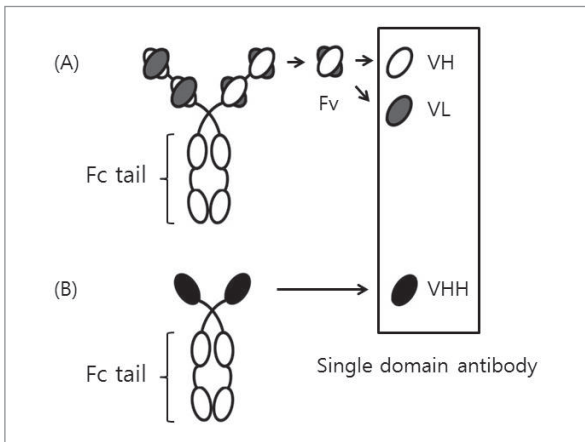


Figure 1. A schematic representation of antibodies. (A) Conventional Ab (B) Heavy chain-only Ab

받았다. 카블리비는 von Willebrand factor(VWF)를 타겟으로 하여 혈전형성을 억제하는 신약으로, FDA는 이를 성인환자에 대해 표준치료와 병용으로 쓰도록 허가했다.

종양 바이오마커로서의 sdAb

방사면역치료(RIT)는 방사선과 항체면역요법의 조합으로 종양세포에 선택적이고 덜 침습적이기 때문에 종양치료법 중 하나로 사용되고 있다. 그러나 기존 항체의 사용은 낮은 종양 투과성과 긴 반감기와 같은 표적화에 부적합한 약동학적 성질을 갖고 있다는 단점이 있다. 이와 대조적으로 방사성동위원소가 표지된 sdAb는 표적 장소에 특이적으로 축적되어 독성을 제한하며 혈액으로부터 빠르게 제거된다(9).

최근 치료에서 방사성추적자로 사용되는 것은 대체로 yttrium-90(⁹⁰Y), iodine-131(¹³¹I), lutetium-177(¹⁷⁷Lu)와 같은 β방출 방사성동위원소다(10). 다발성 골수종 치료를 위해 ¹⁷⁷Lu를 결합시킨 M-단백질에 대한 항체가 여기에 해당한다. M-단백질은 악성형질세포로부터 생성되는데 이에 대한 mAb로 질병의 진행을 억제한다(11). HER2를 표적으로 하는 항체의

예시로는 2Rs15d, 5F7GCC가 있다. 2Rs15d는 ¹⁷⁷Lu와 상호작용을 일으키는 작용기가, 5F7GCC는 N-succinimidyl 4-guanidinomethyl 3-[¹²⁵/¹³¹I]iodobenzonate가 결합되어 있다. ¹³¹I로 라벨링하는 것은 훌륭한 방사선 선량 측정을 보였기 때문에 입자 방사선요법을 표적으로 하는 새로운 유망한 접합체로 평가된다(12).

분자영상의학에서의 sdAb

sdAb의 작은 크기는 안정하고 매우 특이적이며 혈류를 통한 신속한 분배와 균일한 조직 분포, 종양세포 표면에 대한 높은 결합성, 낮은 면역원성을 보인다. 또한 결합하지 않은 sdAb의 경우 빠르게 제거되며 높은 종양 대 배경신호 대비를 주입 후 빠른 시간 내에 보이기 때문에 종양 분자영상 프로브로서 이상적인 조건을 충족한다. 이러한 성질은 alpha-fetoprotein (AFP)에서의 종양 바이오마커로서의 사용가능성을 암시한다. 세포기반 ELISA는 CAIX, PMSA, TAG-72, HER2에 대한 sdAb를 사용했을 때 성공적이었으며 sdAb 생성은 기존의 항체생성보다 쉽기 때문에 알려지지 않은 종양 바이오마커 환자의 샘플과 면역반응을 통해 sdAb를 신속하게 만들 수 있다. 이러한 전략은 cytokeratin19가 유방암의 미세전이를 민감하게 진단할 수 있게 하였다(13).

대표적인 분자영상의학기법으로 SPECT, PET를 들 수 있다. SPECT는 감마선에 기반하며 여기에 사용되는 sdAb에 ^{99m}Tc, ¹⁷⁷Lu, ¹²³I, ¹¹¹In과 같은 방사성 핵종을 결합하여 사용한다. PET에는 positron-emitting radioisotopes 인 ⁶⁸Ga, ¹²⁴I, ⁸⁹Zr이 사용되고 있다(14). EGFR, HER2 와 같은 종양 세포 수용체는 오랫동안 종양 시각화의 주요 타겟이었다. 최근 주목받는 타겟은 전립선암에서 과발현되는 prostate specific membrane antigen

Table 1. Summarized single-domain antibody for molecular imaging

Target	Imaging modality	Tracer	Compound	Stage of development	Potential application	Reference
HER-2	SPECT PET	^{99m} Tc, ⁶⁸ Ga, ¹⁸ F	2Rs15d	Preclinical	유방암	(15)
MMR	SPECT	^{99m} Tc ¹⁸ F	cl1 3.49	Preclinical Preclinical	종양 연관 대식세포	(16, 17)
VCAM-1	SPECT	^{99m} Tc		Preclinical	죽상경화판	(18)
EGFR	SPECT PET	¹⁷⁷ Lu ^{99m} Tc ⁶⁸ Ga	 8B6 7D12,7C12	 Preclinical Preclinical	EGFR 발현 모니터링 편평세포암종	(19) (20, 21)
PMSA		¹¹¹ In ^{99m} Tc	JVZ-007 PSMA30	Preclinical Preclinical	전립선암	(22) (23)

(PSMA)이다. Macrophage mannose receptor (MMR)은 종양 연관 대식세포에 의해 과발현되며 저산소영양에서의 영상을 찍는데 대안으로서 평가받고 있다.

Human epidermal growth factor receptor (HER2)는 유방암, 난소암, 위암을 비롯한 여러 유형의 암에서 과발현되기 때문에 매력적인 치료 표적이다. 이를 표적화하는 sdAb 기반 영상작용제로 PET영상에 사용되는 ⁶⁸Ga-coupled 항 HER2 sdAb (2R15d)가 있다. ⁶⁸Ga으로 표지된 HER2 표적화 sdAb (2Rs15d)는 비임상 연구에서 SKOV-3 xenograft에서 주사 후 1시간에 HER2 양성 유방암의 고 대비 PET 영상화를 가능하게 했다(24). ⁶⁸Ga으로 표지된 2Rs15d는 안전하고 신속하게 노로 배설되어 반감기가 1시간이고 주사 후 1시간이 지나면 혈액에 남아있는 물질의 활성이 10% 밖에 되지 않음을 알 수 있다. 생체분포 데이터는 간, 신장, 적은 범위의 장, 타액선에서 background uptake를 보여주었다. 흡수는 초기 HER2 양성 종양과 악성 종양 모두 높았으며 주입 후 1시간에 표준화된 흡수값(SUV mean)은 각각 11.8과 6.0이었다(25). 또한 PET 영상에서 유용하게 사용되는 보결분자단(prosthetic group)인 N-succinimidyl-4-fluorobenzoate을

활용한 전임상 연구가 진행되었다(26). HER2양성 종양 xenografts에서 sdAb (2Rs15d) 프로브의 특이적 재흡수는 높은 종양 대 혈액 및 종양 대 근육 비율을 보였으며 고 대비 PET영상 촬영 및 빠른 신장 클리어런스(주사 후 3시간 동안 4%)를 나타냈다. 이는 ¹⁸F로 표지된 HER2 표적 sdAb 신장에서 흡수되는 정도가 ⁶⁸Ga으로 표지된 2Rs15d 에 비해 절반 밖에 되지 않아 방사선 노출을 더 감소시킬 수 있었다(27). 또한 ¹³¹I로 표지된 2Rs15d는 HER2 양성 종양을 가진 xenograft mouse 에서 우수한 종양에서의 흡수 및 현저하게 낮은 신장 정체를 나타내었다(28). 또 다른 HER2 표적 sdAb인 5F7은 ¹⁸F로, 5F7GGC는 ¹²⁵I로 방사성 표지되었으며 전임상 연구에서 고 대비 영상화를 입증했다(29, 30). ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu와 같은 β 방출 방사성동위원소가 표지된 항HER2 sdAb는 이온화에 의해 DNA손상을 야기하여 HER2 양성 종양의 증식을 예방했고(9), ²¹³Bi와 ²¹¹At와 결합한 sdAb는 종양 미세전이와 잔존병을 치료하는 경우에 사용된다.

죽상경화증에서 염증반응은 동맥혈관벽 내로 단핵구와 림프구의 광범위한 축적으로 인해 일어나는데 VCAM-1이 여기에 관여한다. 특히 백혈구 침윤이 혈전으로 이어지기 때문에 VCAM-1은 이러한 병변의 비침습적 검출을 위한 분자 표적이다.

^{99m}Tc -cAbVCAM1은 HPLC 결과 방사성동위원소 표지 후 최대 6시간 동안 안정하였고 생체 내 주사 2-3시간 후 SPECT/CT영상화가 이루어졌다. 또한 SPECT/CT를 통해 낮은 심근 대비 혈액 배경활성과 VCAM1발현 조직에서의 특이성을 확인했다(31). 이후 ^{69}Ga , ^{111}In , ^{18}F , ^{99m}Tc 를 표지한 anti VCAM-1 sdAb간 약동학을 비교한 연구에서 체내 흡수도가 ^{99m}Tc -sdAb가 가장 높았으며 각각 ^{69}Ga , ^{111}In , ^{18}F 로 표지된 sdAb 순으로 나타났다. 또한 VCAM-1 knocked-down mouse에서 tracer의 특이도를 확인한 결과 방사성 핵종은 종류에 따라 특정 표적화에 대한 sdAb의 생체 분포에 중요한 영향을 미쳤다(26). 현재 죽상동맥경화플라크의 시각화를 위해 고해상도, 고감도 및 정확한 정량이 가능한 핵 영상화 전략이 가장 추천되고 있다. ^{69}Ga -sdAb는 죽상경화 플라크에 발현하는 VCAM-1에 특이적으로 결합하고 주입 2시간 후 죽상경화플라크 대 배경신호 비율은 ^{99m}Tc 의 경우보다 낮았다.

Macrophage mannose receptor (MMR)는 종양 성장, 종양 혈관 신생, 전이 및 면역 억제에 중요한 역할을 하는 종양 관련 대식세포에서 고도로 발현된다. ^{99m}Tc 를 표지한 sdAb를 이용하여 종양 조직에서 MMR의 존재를 시각화하고 정량화 할 수 있다. 이는 암 치료에 유용한 예측 도구가 될 수 있다는 것을 의미한다. 이를 위해 선택된 항MMR sdAb를 전임상으로 확인하였다. ^{18}F 로 표지된 변이형은 마우스에서 MMR 발현을 위한 PET 추적자로 성공적으로 개발되었으며, 임상에서의 적용 가능성을 확인했다(32, 33). VCAM-1에서 방사성핵종에 따라 큰 차이를 보이지 않은 것과 달리 MMR에 대한 sdAb의 경우 ^{99m}Tc 보다 ^{18}F 를 결합시켰을 때 종양 외 MMR양성 기관에서 활성이 유의미하게 감소했다. 이 실험들은 설치류에서 진행된 것으로 사람에게서 효과를 추정하기가 어렵기 때문에 타겟 발현 정도, 가장 적절한 방사성표지, 약동학, 선량 측정을 최적화하는 과정이 필요하다.

Haung그룹은 ^{99m}Tc 로 방사성표지한 anti-EGFR sdAb (8B6)가 신장에서 빠른 클리어런스 ($t_{1/2}=1.5\text{h}$)와 종양에서 EGFR과 발현 정도에 따라 분명한 분포를 나타낸다는 것을 보였으며 Gaikam그룹은 ^{99m}Tc -7C12은 EGFR에 높은 친화성($3.67 \pm 0.59\text{ nM}$)을 보이며 Erlotinib 처리에 따라 ^{99m}Tc -7C12의 종양 흡수 및 축적이 감소하였음을 확인했다. 즉, 종양에서의 흡수가 정량화되어 EGFR발현 종양의 치료반응 모니터링에 적합하다. 핵 영상화에 사용하기 위해 anti-EGFR sdAb (7D12)는 최근 ^{89}Zr 가 표지된 항체에 사용되었던 킬레이트 p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine (DFO-Bz-NCS)와 결합되었다. 이 7D12-킬레이트는 ^{68}Ga 로 표지되었으며 반감기가 68분으로 cyclotron에서 독립적으로 얻을 수 있다. A431인간 종양 이종 이식편을 갖는 nude mouse에서 높은 종양흡수 및 빠른 clearance가 관찰되었으며 sdAb 기반 방사성 추적자는 완충액과 인간 혈청에서 모두 안정적이었다 (5시간 이내 <2% 방사성붕괴)(4). 전리 방사선 종양 표적화는 sdAb 치료에서 전도유망한 영역이다. 가장 연관있는 생체 내 연구에서 γ -방출 방사선핵종인 ^{177}Lu 를 표지한 항HER2 sdAb의 적용은 완전히 쥐 종양세포 증식을 예방했다.

Conclusion

분자영상의학은 질병의 정확한 진단과 치료에 대한 반응 모니터링의 기초로, 최근 이 영역에서 sdAb기반 프로브를 통해 기존 항체보다 주입 후 짧은 시간 안에 다양한 종양들의 고 대비 영상이 가능해졌다. 기존 항체에 비해 sdAb는 나노단위의 작은 크기, 높은 투과도, 수용액에서의 안정성 및 용해도, 표적에 대한 높은 친화도와 특이성을 갖고 있다. 이러한 성질은 스크리닝 기술에서 충족되지 않은 요구사항들을 해결할 수 있기 때

문에 많은 방사성 리간드, 개발에 대한 연구들이 활발하게 진행되어왔다.(Table 1) 그러나 sdAb의 많은 장점에도 불구하고 고려해야 할 단점들이 있는데, 그 중 하나는 VL 도메인이 없기 때문에 허용될 수 있는 조작의 정도에 제한이 있을 수 있다는 점이다(34). 또한 통상적인 항체와는 달리 작은 분자에 결합하는 경향이 낮다(35). 이러한 한계를 극복하기 위해 형태가 단조로운 인간 중쇄항체를 생성하는 하이브리드 라마/인간 항체를 갖는 형질전환 마우스를 이용한 연구가 이루어지고 있다(36-38). 따라서 sdAb는 앞서 언급한 장점을 바탕으로 추가적인 개선이 이루어진다면 종양의 크기, 위치, 세포 양상 등 정보를 제공할 수 있는 차세대 종양 표적 방사성 추적자로 개발될 수 있으리라 기대한다.

Acknowledgments

This work was supported by the Technology Innovation Program (10067215, Industrial Strategic Technology Development Program-Development of high-integration rapid test kit for on-site availability with single domain antibodies recognizing hazardous chemical agents) funded By the Ministry of Trade, Industry & Energy (MOTIE, Korea).

References

- Herschman HRJS. Molecular imaging: looking at problems, seeing solutions. 2003;302(5645):605-8.
- Menon JU, Gulaka PK, McKay MA, Geethanath S, Liu L, Kodibagkar VD. Dual-modality, dual-functional nanoprobes for cellular and molecular imaging. *Theranostics*. 2012;2(12):1199-207.
- Olafsen T, Wu AM. Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med*. 2010;40(3):167-81.
- Nelson AL. Antibody fragments: hope and hype. *MAbs*. 2010;2(1):77-83.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993;363(6428):446-8.
- Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128(1-3):178-83.
- De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol*. 2014;32(5):263-70.
- Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging? *Theranostics*. 2014;4(4):386-98.
- D'Huyvetter M, Vincke C, Xavier C, Aerts A, Impens N, Baatout S, et al. Targeted radionuclide therapy with A 177Lu-labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*. 2014;4(7):708-20.
- Sharkey RM, Goldenberg DM. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*. 2011;3(3):349-70.
- Lemaire M, D'Huyvetter M, Lahoutte T, Van Valckenborgh E, Menu E, De Bruyne E, et al. Imaging and radioimmunotherapy of multiple myeloma with anti-idiotypic Nanobodies. *Leukemia*. 2014;28(2):444-7.
- Pruszyński M, Koumariou E, Vaidyanathan G, Revets H, Devoogdt N, Lahoutte T, et al. Targeting breast carcinoma with radioiodinated anti-HER2 Nanobody. *Nucl Med Biol*. 2013;40(1):52-9.
- Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002;20(16):3404-12.
- Van Audenhove I, Gettemans J. Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer. *EBioMedicine*. 2016;8:40-8.
- Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, et al. Preclinical screening of anti-

- HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J.* 2011;25(7):2433-46.
16. Movahedi K, Schoonooghe S, Laoui D, Houbracken I, Waelput W, Breckpot K, et al. Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective in vivo imaging of tumor-associated macrophages. *Cancer Res.* 2012;72(16):4165-77.
17. Put S, Schoonooghe S, Devoogdt N, Schurgers E, Avau A, Mitera T, et al. SPECT imaging of joint inflammation with Nanobodies targeting the macrophage mannose receptor in a mouse model for rheumatoid arthritis. *J Nucl Med.* 2013;54(5):807-14.
18. Broisat A, Hernot S, Toczek J, De Vos J, Riou LM, Martin S, et al. Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2012;110(7):927-37.
19. Huang L, Gainkam LO, Caveliers V, Vanhove C, Keyaerts M, De Baetselier P, et al. SPECT imaging with ^{99m}Tc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression. *Mol Imaging Biol.* 2008;10(3):167-75.
20. Vosjan MJ, Perk LR, Roovers RC, Visser GW, Stigter-van Walsum M, van Bergen En Henegouwen PM, et al. Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with ⁶⁸Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011;38(4):753-63.
21. Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, Roovers RC, Stam JC, Mali W, et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging.* 2012;11(1):33-46.
22. Chatalic KL, Veldhoven-Zweistra J, Bolkestein M, Hoeben S, Koning GA, Boerman OC, et al. A Novel (1)(1)In-Labeled Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Nanobody for Targeted SPECT/CT Imaging of Prostate Cancer. *J Nucl Med.* 2015;56(7):1094-9.
23. Evazalipour M, D'Huyvetter M, Tehrani BS, Abolhassani M, Omidfar K, Abdoli S, et al. Generation and characterization of nanobodies targeting PSMA for molecular imaging of prostate cancer. *Contrast Media Mol Imaging.* 2014;9(3):211-20.
24. Xavier C VI, D'Huyvetter M, et al. Synthesis, preclinical validation, dosimetry, and toxicity of ⁶⁸Ga-NOTA-anti-HER2 Nanobodies for iPET imaging of HER2 receptor expression in cancer. *J Nucl Med.* 2013;54:776-84.
25. Keyaerts M XC, 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.
26. Bala G, Crauwels M, Blykers A, Remory I, Marschall ALJ, Dubel S, et al. Radiometal-labeled anti-VCAM-1 nanobodies as molecular tracers for atherosclerosis - impact of radiochemistry on pharmacokinetics. *Biol Chem.* 2019;400(3):323-32.
27. Xavier C BA, Vaneycken I, D'Huyvetter M, Heemskerk J, Lahoutte T, Devoogdt N, Caveliers V. (18)F-nanobody for PET imaging of HER2 overexpressing tumors. *Nucl Med Biol.* 2016;43:247-52.
28. D'Huyvetter M DVJ, Xavier C, et al. ¹³¹I-labeled anti-HER2 camelid sdAb as a theranostic tool in cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2017;23:6616-28.
29. Vaidyanathan G MD, Choi J, et al. Preclinical evaluation of ¹⁸F-labeled anti-HER2 Nanobody conjugates for imaging HER2 receptor expression by immuno-PET. *J Nucl Med.* 2016;57:967-73.
30. Pruszyński M KE, Vaidyanathan G, et al. Improved tumor targeting of anti-HER2 Nanobody through N-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-iodobenzoate radiolabeling. *J Nucl Med.* 2014;55:650-6.
31. A. Broisat ea. Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2012;110:927-37.
32. Movahedi K SS, Laoui D, et al. Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective in vivo imaging of tumor-associated macrophages. *Cancer Res.* 2012;72:4165-77.
33. Blykers A SS, Xavier C, et al. PET imaging of macrophage

- mannose receptor-expressing macrophages in tumor stroma using 18F-radiolabeled Camelid single-domain antibody fragments. *J Nuclear Medicine*. 2015;56:1265-71.
34. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775-97.
35. Helma J, Cardoso MC, Muyldermans S, Leonhardt H. Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *J Cell Biol*. 2015;209(5):633-44.
36. Nguyen VK, Zou X, Lauwereys M, Brys L, Bruggemann M, Muyldermans S. Heavy-chain only antibodies derived from dromedary are secreted and displayed by mouse B cells. *Immunology*. 2003;109(1):93-101.
37. Zou X, Smith JA, Nguyen VK, Ren L, Luyten K, Muyldermans S, et al. Expression of a dromedary heavy chain-only antibody and B cell development in the mouse. *J Immunol*. 2005;175(6):3769-79.
38. Janssens R, Dekker S, Hendriks RW, Panayotou G, van Remoortere A, San JK, et al. Generation of heavy-chain-only antibodies in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(41):15130-5.