

KARAKTERISASI FISIKOKIMIA CTMP BERTANDA TEKNESIUM-^{99m} SEBAGAI RADIOFARMAKA PENYIDIK KANKER TULANG

Isti Daruwati, Misyyetti, dan Maula Eka Sriyani

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri-Batan,
Jl. Tamansari No. 71 Bandung 40132 Tel (022) 2503997 Fax (022) 2504081
E-mail: isti@batan-bdg.go.id

ABSTRACT

Radiopharmaceutical for bone cancer seeking was developed in variable phosphonate compound labeled with technetium-^{99m}, formally pyrophosphate and diphosphonate compound. Either pyrophosphate or diphosphonate still unsatisfied to use as radiopharmaceuticals for bone seeking agent because the high accumulation in liver, muscle and blood. CTMP have higher affinity than others. The Physicochemical characterization of ^{99m}Tc-CTMP has been conducted. The characteristic of labeled compound have to fulfill the criteria as the good radiopharmaceutical. The characteristic such as radiochemical purity, electric charge, lipophilicity, plasma protein binding, and hydroxy apatite binding. The results showed that the radiochemical purity greater than 95% (96,83 % ± 1,35), have a negative electric charge, lipophilicity -2,61, plasma protein binding 31,90 % ± 3,3, hydroxyl apatite binding 76,6% at 3 hours. The value of hidroxy apatite binding was high, it showed CTMP have indicated a great potential as radiopharmaceutical for bone cancer seeking.

Keywords: ^{99m}Tc-CTMP, Bone cancer seeking, Lipophilicity, Plasma protein binding

PENDAHULUAN

Berbagai penyakit kanker seperti payudara, prostat, paru-paru, ginjal, dan tiroid dapat mengalami metastasis ke tulang. Sekira 50–80% penderita kanker payudara dan prostat mengalami metastasis ke tulang. Berdasarkan data kunjungan ke rumah sakit, penderita gangguan tulang maupun kanker tulang metastasis menduduki peringkat tertinggi di rumah sakit yang memiliki fasilitas kedokteran nuklir sejak tahun 2006. Untuk mendiagnosis adanya gangguan pada tulang, radiofarmaka memiliki keunggulan dibandingkan dengan teknik konvensional lainnya karena bersifat *non-invasive*, sensitif, akurat, dan dapat menentukan lokasi kanker tersebut. Radiofarmaka merupakan sediaan obat suntik yang mengandung senyawa radioaktif untuk diagnosis maupun terapi adanya gangguan dan fungsi fisiologis suatu organ.¹

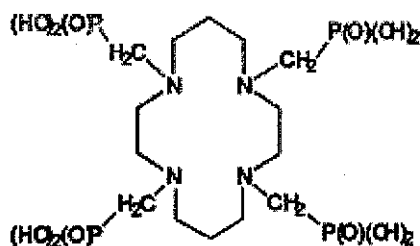
Penentuan kemurnian radiokimia merupakan hal utama yang harus dipenuhi oleh suatu radiofarmaka. Farmakope Inggris²

memberikan batasan kemurnian radiokimia untuk radiofarmaka penyidik tulang e⁺ 95%, sedangkan menurut Farmakope Amerika³ e⁺ 90%. Semakin besar kemurnian radiofarmaka maka semakin kecil jumlah pengotor yang berupa senyawa teknesium bebas dan teknesium tereduksi. Besarnya pengotor radiokimia akan memengaruhi hasil pencitraan pada organ yang dituju. Volkert⁴ menyatakan bahwa idealnya suatu radiofarmaka adalah yang didesain sedemikian rupa sehingga dapat terakumulasi di organ yang akan diperiksa atau kanker, walaupun lokasi kanker tersebut dalam tubuh belum diketahui, dengan memberikan toleransi yang sekecil mungkin terhadap kerusakan yang disebabkan radiasi pada jaringan normal.

Radiofarmaka untuk diagnosis tulang umumnya menggunakan senyawa fosfonat yang ditandai dengan radionuklida teknesium-^{99m} (^{99m}Tc). Pemilihan ^{99m}Tc dikarenakan sifatnya yang ideal sebagai radionuklida untuk diagnosis, antara lain ^{99m}Tc merupakan pemancar gamma murni, dengan energi 140 KeV dan waktu paruh

yang pendek (6 jam). Selain itu, teknesium bersifat mudah berikatan dengan berbagai macam ligan untuk membentuk senyawa kompleks dan mudah diperoleh dari hasil peluruhan Mo-99 hasil reaksi n, g" atau reaksi fisi uranium. Di rumah sakit, proses pemisahan teknesium dari induknya dapat dilakukan dengan mudah menggunakan generator $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Senyawa golongan fosfonat atau pirofosfat merupakan *calcium-seeking agent*. Senyawa tersebut terakumulasi di tulang terutama di daerah perubahan kalsium yang tinggi (*high calcium turnover*) yaitu pada daerah pembentukan tulang yang baru (*osteoblast*) atau kanker tulang dan infark miokardial yang banyak mengandung kalsium fosfat.⁵ Radiofarmaka yang banyak dikenal di pasaran untuk penyidik tulang adalah metilen difosfonat (MDP). PTNBR-Batan berhasil melakukan sintesis CTMP yaitu senyawa 1,4,8,11-tetraazasiklotetradesil-1,4,8,11-tetrametilenfosfonat seperti tertera pada Gambar 1 dengan bahan dasar siklam sebagai alternatif radiofarmaka penyidik tulang yang memiliki keunggulan dibandingkan MDP.



Gambar 1. Struktur CTMP

Pemilihan senyawa ini berpedoman pada pernyataan Hashimoto⁶ yang mengemukakan bahwa absorpsi senyawa fosfonat pada tulang dipengaruhi oleh jumlah gugus fosfonat dan interaksi gugus fosfonat dalam kompleks dengan kalsium pada permukaan hidroksi apatit. Derivat senyawa tetrafosfonat seperti CTMP mempunyai empat buah gugus fosfonat dan empat buah gugus amino. Gugus amino tersebut merupakan sisi untuk terikat dengan teknesium-99m sehingga tidak mengganggu afinitas terhadap tulang karena gugus tetrafosfonat tetap dalam bentuk bebas. Adapun senyawa MDP hanya mempunyai dua gugus fosfonat dan tidak memiliki gugus amin sehingga teknesium-99m yang terikat pada gugus fosfonat tersebut digunakan untuk membentuk koordinasi dan tidak ada gugus fosfonat dalam keadaan bebas. Hal ini dapat menyebabkan

afinitas kompleks CTMP dengan teknesium-99m lebih tinggi dibandingkan dengan MDP.^{7,8,9}

Semua perubahan sifat fisikokimia dan farmakokinetik berperan untuk penempatan senyawa bifosfonat pada tulang. Akurasi dari suatu diagnosis dengan menggunakan radiofarmaka ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain kualitas radiofarmaka yang digunakan. Oleh karena itu karakterisasi dari senyawa radiofarmaka baru, sangat penting dilakukan. Dalam makalah ini karakterisasi dibatasi dari segi fisikokimia sedangkan untuk sifat biologis akan dibahas tersendiri. Ruang lingkup dari penelitian ini adalah penentuan kemurnian radiokimia, muatan listrik, lipofilisitas, ikatan dengan protein plasma dan ikatan dengan hidroksi apatit dari senyawa bertanda yang terbentuk:

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah 1,4,8,11-tetraazasiklotetradesil-1,4,8,11-tetrametilen fosfonat (CTMP) buatan PTNBR¹⁰, SnCl_2 (E. Merck), NaHCO_3 (E. Merck) dan Na_2HCO_3 (E. Merck), larutan NaCl fisiologis steril (IPHA) dan *aqua bidest* steril (IPHA), oktanol (E. Merck), aseton (E. Merck), plasma darah manusia (PMI), hidroksi apatit (E. Merck), kertas kromatografi Whatman 3 MM dan radionuklida teknesium-99m yang berasal dari generator $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Batan Teknologi).

Peralatan yang digunakan terdiri dari tabung reaksi, alat sentrifuga (Fisher), *vortex-mixer* (Retesh), jarum suntik *disposable* (Terumo), pencacah gamma saluran tunggal (Ortec), *Delux Isotop Calibrator* (Victoreen), pemanas dengan *magnetic stirrer* (Nuova II), satu perangkat alat kromatografi kertas, satu perangkat alat elektroforesis (Gelman), timbangan analitis (Metler Toledo), pipet mikro (eppendorf) dan alat-alat gelas lainnya.

Penandaan CTMP dengan radionuklida teknesium-99m¹¹

Penandaan dilakukan dengan mereaksikan 100 μL larutan CTMP (konsentrasi 5 mg/ml dalam larutan dapar karbonat 0,2 M pH 9,2 dengan 100 μL larutan SnCl_2 (konsentrasi 1 mg/ml dalam larutan asam klorida encer). Larutan diatur pada pH 6–6,5 kemudian ditambahkan larutan natrium perteknetat ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) dengan aktivitas 2-5 mCi,

lalu diinkubasi di air mendidih selama 15 menit sehingga terbentuk kompleks ^{99m}Tc -CTMP.

Penentuan Kemurnian Radiokimia

Kemurnian radiokimia ditentukan dengan metode kromatografi. Kertas kromatografi Whatman 3 MM dengan ukuran 1 x 12 ditandai setiap 1 cm dengan pensil dan diberi nomor dari 1 sampai 10. Larutan ^{99m}Tc -CTMP ditotolkan pada titik nol, kemudian dielusi secara menaik dengan dua macam fase gerak antara lain NaCl fisiologis dan aseton sampai skala 10. Fase gerak aseton digunakan untuk memisahkan pengotor radiokimia ^{99m}Tc perteknetat bebas sedangkan NaCl digunakan untuk memisahkan pengotor radiokimia ^{99m}Tc -tereduksi bebas. Setelah dielusi, kertas dikeringkan dan dipotong setiap satu skala (1 cm) dan setiap potongan dicacah dengan pencacah gamma saluran tunggal. Hal yang sama dilakukan terhadap blanko (larutan natrium perteknetat dan ^{99m}Tc -tereduksi). Larutan ^{99m}Tc -tereduksi dibuat dengan mereduksi $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dengan SnCl_2 . Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -CTMP dihitung berdasarkan hasil cacahan yang diperoleh.

Penentuan Muatan Kompleks ^{99m}Tc -CTMP

Muatan listrik dari senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP ditentukan dengan metode elektroforesis kertas menggunakan kertas Whatman 3MM ukuran 31 x 1 cm ditandai setiap 1 cm mulai dari -15 s.d. +15 dan larutan bufer karbonat 0,2 M pH 9,2 sebagai elektrolit. Setelah larutan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP ditotolkan di atas kertas, kemudian arus listrik dialirkan dengan tegangan listrik sebesar 350 Volt selama 2 jam dan arus 5 mA. Kertas diangkat dan dikeringkan, kemudian dipotong-potong tiap cm dan setiap potongan kertas dicacah dengan pencacah saluran tunggal. Sebagai pembanding dilakukan hal yang sama terhadap larutan perteknetat (TcO_4^-) sebagai anion dan larutan TcO_2 sebagai senyawa netral.

Penentuan Lipofilisitas (Koefisien Partisi)

Pengukuran kompleks ^{99m}Tc -CTMP didasarkan kepada koefisien distribusi senyawa kompleks tersebut dalam fase organik (n-oktanol) dan fase air. Radioaktivitas dari setiap fase tersebut dicacah. Lipofilisitas dihitung sebagai log P yaitu log perbandingan cacahan dalam fase oktanol dan fase air.

Penentuan Ikatan dengan Protein Plasma

Ke dalam 6 buah tabung reaksi dimasukkan 0,5 ml plasma darah, kemudian dimasukkan 25 ml senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP (aktivitas 40–80 mCi). Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama waktu tertentu (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 menit, 2 jam, dan 3 jam). Pada setiap interval waktu tersebut, ke dalam tiap-tiap tabung dimasukkan 0,5 ml larutan TCA 10 % sehingga terbentuk dua fase. Campuran divortex selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Pisahkan endapan dan filtrat, kemudian endapan dicuci dengan *aqua bidest*. Campuran divortex selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Fraksi endapan dan filtrat dipisahkan. Masing-masing fraksi dicacah. Aktivitas fraksi endapan dan filtrat diukur, kemudian dihitung persentase endapan.

Penentuan Ikatan dengan Hidroksi Apatit

Karakteristik ikatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dengan hidroksi apatit dilakukan dengan menentukan waktu inkubasi yang optimal. Sebanyak 0,5 ml suspensi hidroksi apatit dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi, lalu ditambahkan 5–10 ml larutan ^{99m}Tc -CTMP dikocok dengan *vortex mixer* lalu diinkubasi pada suhu 37 °C dengan waktu inkubasi bervariasi mulai dari nol menit sampai 24 jam. Setelah waktu inkubasi, campuran tersebut dikocok kembali dengan *vortex mixer* lalu disentrifugasi selama 3–5 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Endapan dan larutan dipisahkan dan masing-masing dicacah dengan pencacah gama saluran tunggal. Persentase ikatan hidroksi apatit dihitung dari hasil cacahan fase padat dibandingkan dengan jumlah cacahan fase padat dan fase cair dikalikan 100%.

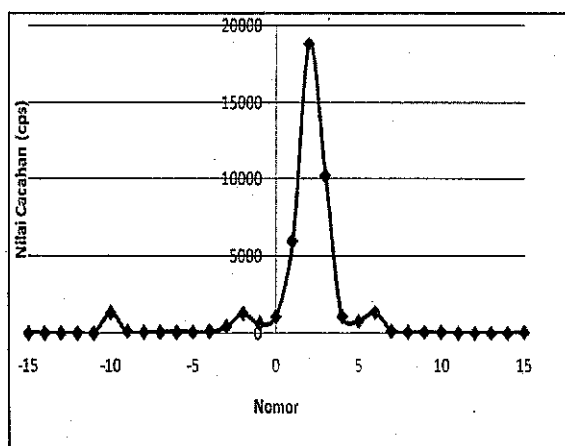
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diperoleh kemurnian radiokimia sebesar 96,83 % $\pm$ 1,35%. Nilai ini memberikan hasil yang memuaskan karena memenuhi persyaratan radiofarmaka menurut Farmakope Inggris yaitu kemurnian radiokimia $\geq$ 95%. Karakteristik senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Senyawa Bertanda ^{99m}Tc -CTMP

No.	Karakteristik	Nilai
1	Kemurnian radiokimia	96,83 % $\pm$ 1,35 %
2	Muatan listrik	Negatif/anion
3	Lipofilisitas	-2,61
4	Ikatan protein plasma	31,9 % $\pm$ 3,3 %
5	Ikatan hidroksi apatit optimum	76,6 % pada waktu 3 jam

Muatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dilakukan dengan metode elektroforesis. Larutan yang mengandung senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP ditotolkan pada titik nol, kemudian dielusi selama dua jam dengan tegangan 350 Volt. Seperti tertera pada Gambar 2, kompleks ^{99m}Tc -CTMP bergerak ke arah anoda yang bermuatan positif. Gerakan senyawa ini searah dengan gerakan $^{99m}\text{TcO}_4^-$, yang menunjukkan bahwa kompleks ^{99m}Tc -CTMP bermuatan negatif. Muatan negatif ini disebabkan oleh adanya gugus fungsi fosfonat dari senyawa CTMP sebanyak 4 buah.



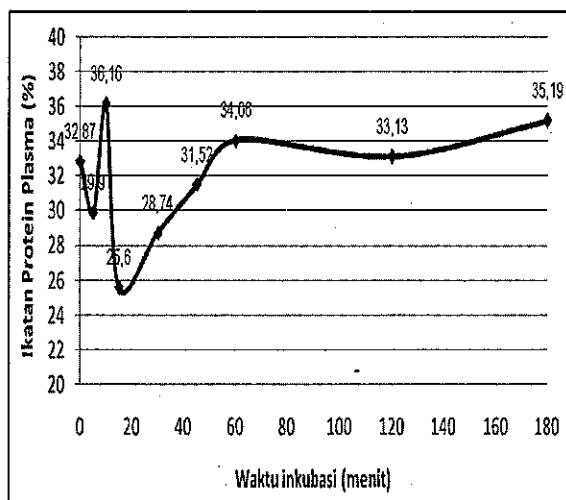
Gambar 2. Kurva ^{99m}Tc -CTMP dengan metode elektroforesis kertas

Lipofilisitas merupakan indeks untuk memprediksi sifat-sifat osteotropik dari derivat bifosfonat, dalam hal ini senyawa CTMP. Lipofilisitas senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dinyatakan dengan log P sebagai nilai untuk mengetahui kepolaran senyawa tersebut atau sebaliknya. Pada penentuan lipofilisitas diperoleh nilai log P sebesar -2,61. Angka ini menunjukkan bahwa senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP bersifat sangat hidrofil yaitu senyawa yang mudah larut dalam air. Konjugasi senyawa bifosfonat umumnya bersifat hidrofilik disebabkan oleh sifat

asam dari senyawa bifosfonat pada pH fisiologis. Oleh karena itu, senyawa ^{99m}Tc -CTMP akan sulit untuk menembus membran biologis dari jaringan lunak yang bersifat lipofil seperti sawar otak dan sebaliknya akan menaikkan *urinary excretion* karena jaringan ini bersifat hidrofil.

Besarnya ikatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dengan protein plasma menunjukkan banyaknya sediaan tersebut terikat dalam protein di dalam darah. Besarnya satuan ini tidak mempunyai batasan yang spesifik, tetapi bergantung pada karakter sediaan masing-masing. Ikatan dengan protein plasma memberikan efek distribusi pada jaringan dan pembersihan dari plasma (*plasma clearance*) serta *uptake*-nya oleh organ atau jaringan yang dituju. Oleh karena itu, besaran ini untuk suatu radiofarmaka baru harus selalu ditentukan sebelum penggunaan klinis. Percobaan secara *in-vitro* dilakukan dengan kondisi seperti dalam tubuh yaitu dalam suhu 37°C dengan menggunakan plasma darah manusia (pH 7,4).

Pada Gambar 3 terlihat bahwa rerata ikatan antara senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dengan protein plasma adalah 31,9 % $\pm$ 3,3 %. Pada menit ke-15, ikatan protein plasma turun menjadi 25,6%. Hal ini menunjukkan bahwa pada awalnya ikatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dengan plasma cukup besar namun ikatan ini belum terikat kuat sehingga mudah lepas. Pada saat ikatan dengan protein plasma menurun disertai dengan peningkatan ikatan pada hidroksi apatit seperti tercantum pada Gambar 4. Setelah satu jam, karakteristik ikatan protein plasma ini cenderung stabil hingga 3 jam. Ikatan dengan protein plasma akan dapat menggambarkan bagaimana kecenderungan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP terikat pada darah dan tingkat penurunannya di dalam darah. Hal ini akan berpengaruh pada waktu paruh biologis karena semakin cepat waktu paruh biologis maka senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP akan semakin cepat diekskresikan dalam tubuh. Percobaan ini dilakukan secara *in-vitro* dengan perlakuan yang diusahakan sama dengan kondisi di dalam tubuh. Namun demikian, sebagai pembanding perlakuan secara *in-vivo* tetap harus dilakukan dengan melakukan uji *renal* dan *blood clearance* karena kondisi secara *in-vitro* hanya dapat diupayakan dari suhu dan pH larutan, sedangkan faktor-faktor yang disebabkan oleh kinerja dari organ seperti hati dan ginjal tidak dapat disesuaikan.



Gambar 3. Persentase ikatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dengan protein plasma berdasarkan variasi waktu inkubasi

Senyawa yang digunakan untuk diagnosis atau terapi tulang adalah senyawa yang mempunyai afinitas tinggi terhadap hidroksi apatit. Senyawa bifosfonat diketahui dapat terlokalisasi pada permukaan tulang dengan cepat setelah diberikan secara intravena. Gugus P-C-P dari struktur bifosfonat mempunyai afinitas tinggi terhadap hidroksi apatit. Oleh karena itu, modifikasi dari senyawa bifosfonat adalah untuk memperoleh senyawa yang dapat selektif untuk tulang.

Hidroksi apatit yang dipasarkan hanya dalam bentuk suspensi, maka pengocokan tidak dilakukan selama waktu inkubasi. Hal ini dipilih untuk mendekati kondisi dalam tubuh di mana tulang tidak dalam bentuk suspensi tapi dalam bentuk padat. Dengan inkubasi tanpa pengocokan maka hidroksi apatit berada pada dasar tabung sehingga mendekati kondisi tulang. Reaksi dengan senyawa dalam bentuk suspensi ada dua kemungkinan mekanisme reaksi, yaitu reaksi secara kimia dan reaksi secara fisika yaitu terjadi kopresipitasi atau dapat juga ikatan karena sifat fagosit dari suspensi.

Hidroksi apatit merupakan senyawa utama di dalam komposisi tulang berupa garam kalsium fosfat. Senyawa CTMP bertanda teknesium akan berikatan dengan hidroksi apatit yang ada pada tulang secara kimia. Oleh karena itu untuk berikatan dengan tulang dibutuhkan waktu yang cukup. Pada Gambar 4 terlihat bahwa pada waktu 15 menit inkubasi, ikatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dengan hidroksi apatit mencapai 52,6% kemudian meningkat hingga 3 jam. Sebelum

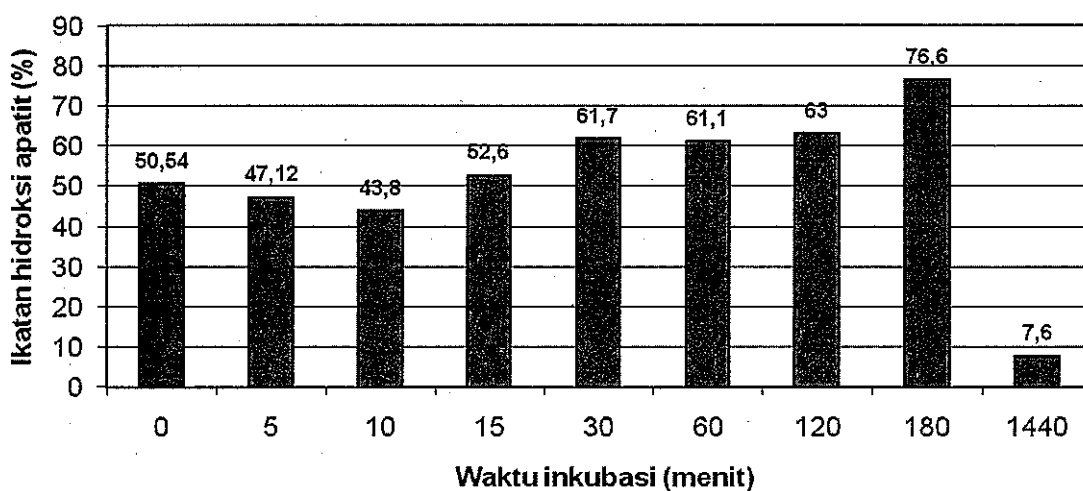
mencapai 15 menit, ikatan antara senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP terjadi penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa ikatan secara kimia masih belum kuat sehingga mudah lepas namun setelah 1 jam terjadi peningkatan hingga optimum pada jam ke-3.

Penyidikan tulang dengan kamera gama di rumah sakit umumnya dilakukan pada 2–3 jam pasca injeksi karena umumnya senyawa fosfonat dapat terikat dengan kuat pada tulang setelah 2 jam. Dari Gambar 4, tampak bahwa senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP telah terikat cukup kuat di tulang pada waktu 30 menit sebesar 61,7% hingga diperoleh ikatan optimum pada waktu 3 jam sebesar 76,6%. Berdasarkan data tersebut, pencitraan tulang menggunakan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dapat dilakukan lebih cepat dibandingkan menggunakan senyawa lain. Hal ini akan menguntungkan pasien di rumah sakit sehingga tidak perlu menunggu terlalu lama. Dalam penentuan waktu pencitraan, data ikatan hidroksi apatit perlu dibandingkan dengan data protein plasma dan uji biologis. Hal ini penting dilakukan karena walaupun ikatan hidroksi apatit menunjukkan ikatan yang kuat setelah 30 menit namun akumulasi di organ lain seperti otot dan darah harus menunjukkan ikatan yang lebih rendah sehingga hasil pencitraan dengan kamera gama akan lebih bersih.

Ikatan dengan hidroksi apatit pada 24 jam mengalami penurunan hingga diperoleh persentase sebesar 7,6%. Dengan penurunan ini diharapkan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP tidak tertahan lama dalam tubuh, walaupun awalnya cukup kuat terikat pada senyawa hidroksi apatit. Hal ini juga akan menguntungkan pasien yang menjalani diagnosis dengan radiofarmaka CTMP. Sebagai radiofarmaka baru, karakterisasi secara fisiko kimia perlu ditunjang dengan uji biologis sebagai bagian dari uji preklinis dan dilanjutkan dengan uji klinis.

KESIMPULAN

Senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP memiliki karakteristik bersifat hidrofil, dengan kelarutan yang tinggi pada fase air, dengan $\log P = -2,61$, mempunyai muatan listrik negatif atau bersifat anion, ikatan dengan hidroksi apatit cukup tinggi sebesar 76,6% setelah 3 jam dan ikatan plasma sebesar $31,90\% \pm 3,3\%$. Efisiensi penandaan yang diperoleh $96,83\% \pm 1,35\%$ (memenuhi standar farmakope Inggris E" 95 %) sehingga



Gambar 4. Persentase ikatan ^{99m}Tc -CTMP dengan hidroksi apatit berdasarkan variasi waktu inkubasi

dapat digunakan sebagai radiofarmaka penyidik kanker tulang. Sebagai radiofarmaka baru, penelitian selanjutnya akan diarahkan pada uji preklinik dan uji klinik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Entit Susilawati yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Zolle, Ilse. 2007. *Technetium-99m Pharmaceuticals Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*. Austria: Springer.
- ²British Pharmacopoeia. 2003. Crown. Available on CD.
- ³The United State Pharmacopoeia. 2002. (<http://nuclearpharmacy.uams.edu/procl.htm>).
- ⁴Volkert WA and Hoffman TJ. 1999. "Therapeutic Radiopharmaceuticals". *J. Chem.*, 99:2269–92.
- ⁵Ogawa K., Mukai T., Inoue Y., Ono M., and Saji H. 2006. "Development of a Novel ^{99m}Tc -Chelate-Conjugated Biphosphonate with High Affinity for Bone As Bone Scintigraphic Agent". *J. Nuclear Medicine*, 47(12): 2042–2047.
- ⁶Hashimoto, K. 1999. "Labelling of Aminomethylene-phosphonate Derivatives With Generator-produced ^{188}Re and Study of Their Stability". *Appl. Radiat. Isot.*, 51:307–313.
- ⁷Kothari K., Samuel G., Banerjee S., Unni PR., and Sarma HD. 2001. " ^{186}Re -1,2,8,11-tetraazacyclo-tetradecyl-1,2,8,11-tetramethylene phosphonic acid: A Novel agent for Possible Use in Metastatic Bone-Pain Palliation". *Journal Nuclear Medicine and Biology*, 28: 709–717.
- ⁸Hibarayashi H., and Fujisaki J. 2003. "Bone-specific Drug Delivery System: Approaches via Chemical Modification of Bone-Seeking Agents". *Journal Clinical Pharmacokinetic*, 42: 1319–30.
- ⁹Jae Min Jeong., Sun HH., Young JK., and Dong SL. 2001. "N,N,N,N-Tetra alkylcyclam Derivatives: Synthesis ^{99m}Tc -labelling and Biological Properties". *J. Labelled Cpd Radiopharm*, 44: 277–85.
- ¹⁰Misyetti, Daruwati I., Susilawati E., dan Isabela I. 2005. "Sintesis CTMP sebagai Bahan Dasar untuk Pembuatan CTMP bertanda Radioaktif". *Prosiding Seminar Sains dan Teknologi Nuklir, PTNBR-Batan*, Bandung, 14–15 Juni 2005.
- ¹¹Misyetti, dan Daruwati I. 2008. "Penandaan CMP dengan Teknesium- 99m untuk Radiofarmaka Penyidik Kanker Tulang". *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia*, 19(2): 79–88.
- ¹²Gunawan HA, Muthalib A, Aguswarini S., Karyadi, Bagiawati S., dan Abidin. 2005. "Evaluasi Biologis Radiofarmaka ^{186}Re -EDTMP sebagai Alternatif Bone Pain Palliative Agent. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknik Nuklir, P3Tkn-Batan*, Bandung: 46–52.

¹³Hibarayashu H., and Fujisaki J. 2003. "Bone-specific Drug Delivery System: Approaches via Chemical Modification of Bone-Seeking Agents". *Clinical Pharmacokinetics*, 42 (15): 1319–30.

¹⁴Smith H., Navani A., and Fishman SM. 2004. "Radiopharmaceuticals for Palliation of Painful Osseous Metastases". *American Journal of Hospice & Palliative Medicine*, 21(4): 303–313.

¹⁵Banerjee S., Chakraborty S., Das T., Kothari K., Samuel G, Venkatesh M., and M.R.A. Pillai. 2004. "¹⁷⁷Lu-DOTMP, ¹⁵³Sm-DOTMP, ¹⁷⁵Yb-EDTMP and ^{186/188}Re-CTMP: Novel Agents for Bone Pain Palliation and Their Comparison with ¹⁵³Sm-EDTMP". International Symposium on Nuclear Oncology held at Porto Alegre, Brazil, January 2004.