

Trabajo científico

Caracterización espectroscópica de la unión de Docetaxel a la albúmina sérica humana

Spectroscopic characterization of Docetaxel binding to human serum albumin

Maripaz Márquez,² Liliana Quintanar,¹ Gilberto Castañeda-Hernández.²

¹Departamento de Química

²Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional

Resumen

El Docetaxel es un antineoplásico cuya presentación comercial es Taxotere. La unión de Docetaxel a las proteínas plasmáticas para su distribución son etapas críticas en la farmacocinética que determinan los efectos adversos. La distribución de Docetaxel depende mayoritariamente de la proteína plasmática albúmina sérica humana (del inglés, HSA). El presente estudio evaluó la unión de Docetaxel a la HSA, utilizando la técnica de absorción electrónica. Se realizaron pruebas de tiempo de incubación proteína-fármaco, concentración de Docetaxel y paso óptico. Se concluye que las condiciones óptimas para estudiar la interacción Docetaxel-HSA implica utilizar concentraciones de 4 a 28 μ M de Docetaxel, 2 μ M de proteína, sin incubar los reactivos y utilizando un paso óptico de 0.5 cm. En este trabajo se evaluó la unión de la HSA al Docetaxel en presentación Taxotere, y en principio, esta prueba podría ser implementada para evaluar la unión Docetaxel-HSA cuando el fármaco se encuentra en diferentes formulaciones.

Abstract

Docetaxel is an antineoplastic commercially called Taxotere. The union of Docetaxel to plasmatic proteins for its distribution is a critical step of the pharmacokinetics process that determines their adverse effects. The main plasma protein involved is human serum albumin (HSA). In this study, we evaluated the binding of Docetaxel to HSA using electronic absorption spectroscopy. The effects of incubation time after the addition of Docetaxel to HSA, reagents concentration and optical path length were evaluated. We concluded that the best conditions to evaluate Docetaxel-HSA interaction are: 4 to 28 μ M of Docetaxel, 2 μ M protein, without incubation of reagents, and using a 0.5 cm path length. In this work, we evaluated the binding of HSA to Docetaxel in Taxotere presentation, and the probe here developed could be applied to evaluate Docetaxel-HSA binding in different formulations.

Palabras clave: espectroscopia, Docetaxel, proteínas plasmáticas.

Key words: spectroscopy, Docetaxel, plasma proteins.

Correspondencia:

M en C. Maripaz Márquez Quiroz
Departamento de Farmacología
Cinvestav
Av. IPN No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México,
07360, D. F.
Tel. +52-55-57473800 ext. 4414
Fax. +52-55-57473389
e-mail: mpmarquez@cinvestav.mx

Fecha de recepción: 26 de septiembre de 2012

Fecha de recepción de modificaciones:

29 de enero de 2013

Fecha de Aceptación: 05 de febrero de 2013

Introducción

El Docetaxel (N-debenzoil-N-tert-butoxicarbonil-10-desacetil taxol) es un fármaco antineoplásico de la familia de los taxanos, es lipofílico y de origen semi-sintético. El Docetaxel es obtenido a partir de la 10-diacetil baccatina III, la cual es extraída del árbol del tejo *Taxus baccata*. El Docetaxel impide la división celular y promueve la apoptosis. Su mecanismo de acción implica su unión a la β -tubulina, estabilizando a los microtúbulos del cito esqueleto, lo cual afecta el ciclo celular en las fases S y G2/M, y la célula ya no puede llevar a cabo el proceso de mitosis.¹ El Docetaxel fue desarrollado por Sanofi-Aventis con el nombre comercial de Taxotere. El Docetaxel fue sintetizado en 1985, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) para el tratamiento el tratamiento del cáncer de ovario en abril de 1994 y para el cáncer de pulmón en diciembre de 1999. También fue aprobado en Europa en 1995, por lo que más de 100 países tuvieron acceso al Docetaxel para el tratamiento del cáncer de mama, pulmón, próstata, estómago, cabeza y cuello.¹⁻⁷

La farmacocinética de Docetaxel inicia con la liberación del fármaco del vehículo polisorbato 80 (tween 80) desde que comienza la infusión. Para su distribución, el Docetaxel se une en un 98% a las proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) y a la α_1 -ácido-glicoproteína (AAG),⁷ alcanzando un volumen de distribución (Vd) de 60.3 L/m² con una administración de 70 mg/m², y un tiempo de vida media terminal ($t_{1/2}$ terminal) de 11.1 horas. El área bajo la curva (AUC) aumenta de forma lineal al incrementar la dosis de Docetaxel (60-100 mg/m²).^{1, 8, 9} Estudios con pacientes con cáncer de pulmón han establecido una relación entre el AUC y la progresión del tumor.⁹

Las etapas de liberación y unión a las proteínas plasmáticas son fundamentales para disminuir los efectos adversos de Docetaxel, como la neutropenia.⁹ La proteína plasmática más sobresaliente en la captación y distribución de los fármacos es la albúmina sérica humana (HSA), la cual es la proteína plasmática más abundante en el torrente sanguíneo, por lo tanto es la encargada de mantener la presión oncotíca. La HSA tiene gran afinidad para captar y transportar un amplio intervalo de compuestos endógenos y exógenos. Entre los compuestos endógenos destacan: metales como el cobre y el zinc, ácidos grasos, aminoácidos, metabolitos como la bilirrubina y hormonas. Los compuestos exógenos son xenobióticos, generalmente fármacos.¹⁰⁻¹² La concentración de HSA en un individuo sano es de 696 μ M, sin embargo, en algunas patologías esta concentración puede disminuir hasta 550 μ M.⁷ Dichas patologías pueden ser: la cirrosis hepática, el síndrome nefrótico, la desnutrición, el aumento del catabolismo como

resultado de un daño tisular o la inflamación y/o algunas enfermedades genéticas.⁷ La HSA es una proteína de una sola cadena polipeptídica formada por 585 aminoácidos, 17 puentes disulfuro, con un peso molecular de aproximadamente 66,500 Da; su tiempo de vida media es de 19 días y sus constantes de afinidad para unir una amplia gama de agentes terapéuticos son del orden de 10^4 a 10^6 M⁻¹.¹²⁻¹⁴ La HSA tiene una estructura secundaria predominantemente de α -hélice, tiene tres dominios homólogos (I, II y III), donde cada dominio consta de dos subdominios (A y B) que están conectados por asas flexibles. La HSA tiene 2 sitios principales de unión a compuestos endógenos (ácidos grasos, bilirrubina) y exógenos (warfarina, diazepam, ibuprofeno) de naturaleza ácida ubicados en los subdominios IIa y IIIa.^{11, 12, 14} La especificidad de unión de cada sitio está determinada por su forma y por la distribución de los residuos básicos y polares en el interior de las paredes hidrofóbicas.¹⁵

Debido a que el Docetaxel es ampliamente utilizado (cáncer colorectal, de mama, ovario, próstata, pulmón, cuello, cabeza, endometrio y estómago) es importante evaluar la calidad de sus formulaciones. El control de calidad de Docetaxel después de su síntesis involucra pruebas como difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojo, calorimetría y resonancia magnética nuclear. Una vez en formulación, el Docetaxel es almacenado en un frasco de vidrio con atmósfera de nitrógeno, de donde se continúa con la prueba de estabilidad del principio activo. El Docetaxel es estable de 40±2 °C y de 25±2 °C durante 6 meses y 36 meses, respectivamente. El Docetaxel es inestable después de exposición a rayos UV. Adicionalmente, a la formulación de Docetaxel se le hacen pruebas de examinación visual, identificación del principio activo y de impurezas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés),¹⁶ sin embargo no sigue el proceso tradicional de bioequivalencia. Por lo anterior es necesario diseñar métodos *in vitro* que aporten información sobre las propiedades de una formulación de Docetaxel. El grupo de Vial en 2008 analizó 31 formulaciones genéricas de Docetaxel comercializadas en América Latina, Asia, África y Medio Oriente por cromatografía líquida de alta presión (HPLC); de los cuales 21 genéricos tienen menos del 90% de Docetaxel y 23 genéricos tienen más del 3% de impurezas.² La aplicación de nuevos métodos en cromatografía permite la evaluación de impurezas y la estabilidad de la muestra, brindando información sobre la calidad farmacéutica de Docetaxel.¹⁷ En base al estudio publicado en el año 2009 por Cheng y colaboradores, donde evaluaron la interacción de Docetaxel con la albúmina sérica humana, utilizando espectroscopías como absorción electrónica en la región UV-Vis, fluorescencia, infrarrojo y dicroísmo circular,¹⁸ el presente trabajo evalúa la unión de Docetaxel con HSA por absorción electrónica. Estudiar la unión de Docetaxel a la HSA por espectroscopía aportará información a futuras

investigaciones para evaluar la unión de este fármaco y para implementar una técnica que evalúe una determinada formulación y la unión de Docetaxel a las proteínas plasmáticas.

Material y método

Preparación de las muestras

Se utilizó Docetaxel en la presentación Taxotere 80 mg, la cual consiste de dos ámpulas: una contiene Docetaxel con polisorbato 80 y la otra contiene etanol al 13%. Para su uso, se mezclaron ambas ámpulas y se obtuvo el espectro inmediatamente después de preparar la muestra. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C y protegidas de la luz. Para las técnicas espectroscópicas se utilizó albúmina sérica humana (HSA, A1887, Sigma-Aldrich) en concentración de 2 μ M en buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.4.

Absorción electrónica en la región UV-Vis

Se midió el espectro de absorción electrónica de 190 a 300 nm, colectando datos cada nanómetro, utilizando un espectrofotómetro UV-Visible de arreglo de diodos (Agilent 8453), se obtuvieron espectros con concentraciones crecientes de Docetaxel de 4 a 28 μ M. La concentración de proteína HSA fue de 2 μ M. Se utilizaron celdas de cuarzo grado *Spectrosil* con rango de uso de 170 a 2700 nm de diferentes pasos ópticos (0.2, 0.5 y 1 cm).

Resultados y discusión

La técnica de absorción electrónica permite identificar el espectro de Docetaxel y también es útil para explorar el cambio que puede sufrir una proteína al formar un complejo con un fármaco u otra molécula.

Se tomó el espectro de Docetaxel a concentraciones crecientes del fármaco: 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 μ M. El espectro de absorbancia de Docetaxel presenta máximos de absorción a 199 ± 1 nm y 234 ± 1 nm, con coeficientes de extinción molar de $86,600 \pm 6,980$ y $56,660 \pm 6,170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente (Figura 1A, líneas punteadas). También se colectó el espectro de absorción de la proteína sin Docetaxel, para la HSA el máximo de absorción está en 207 ± 2 nm, con un coeficiente de extinción molar de $1,040,600 \pm 40,510 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para conocer el comportamiento de la proteína en presencia de Docetaxel, se midió el espectro de la proteína HSA con Docetaxel a concentraciones crecientes de 4 a 28 μ M (Figura 1A, líneas sólidas), al cual se le restó el espectro del fármaco en la concentración correspondiente. En la figura 1B, se muestra la resta del espectro de proteína con Docetaxel menos su correspondiente espectro de Docetaxel solo.

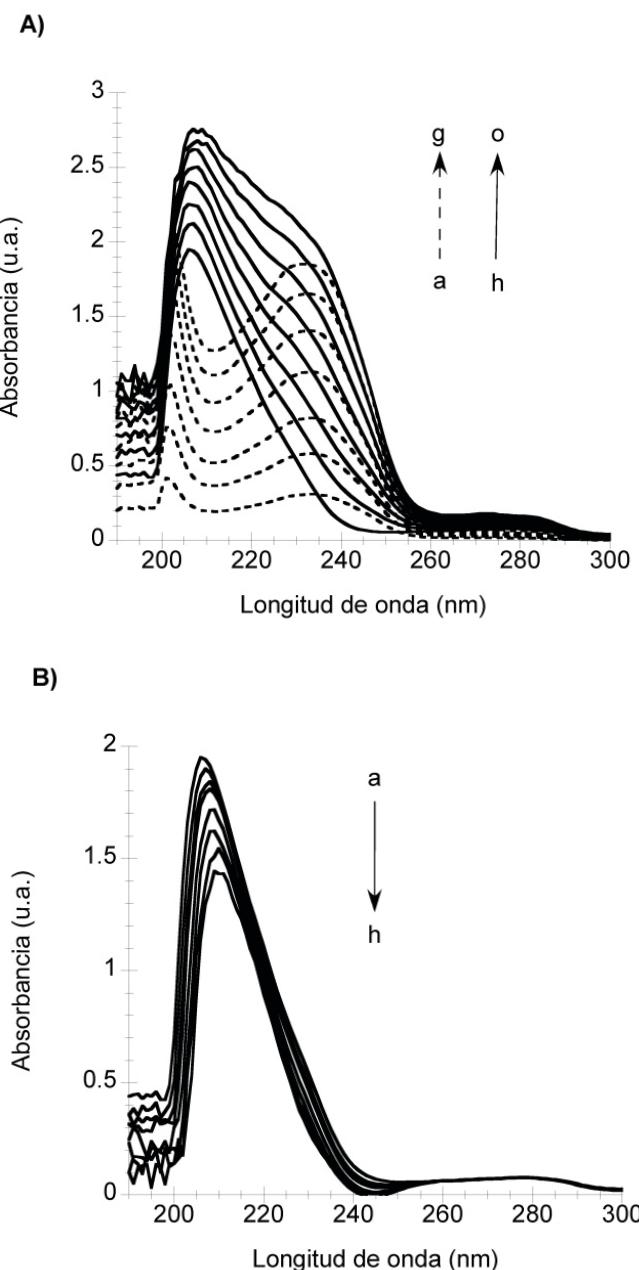


Figura 1. Espectros de absorción electrónica en la región UV-Vis de la HSA en presencia de Docetaxel (4-28 μ M) con un paso óptico de 1 cm. A) Espectros de: Docetaxel a diferentes concentraciones (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 μ M), líneas punteadas (a g, respectivamente); HSA (2 μ M), línea sólida (h); y HSA en presencia de concentraciones crecientes de Docetaxel (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 μ M), líneas sólidas (i o, respectivamente). B) Diferencia de espectros de absorción de HSA (a, 2 μ M) con Docetaxel menos el espectro de Docetaxel solo, a diferentes concentraciones del fármaco (b=4 μ M, c=8 μ M, d=12 μ M, e=16 μ M, f=20 μ M, g=24 μ M, h=28 μ M).

Al adicionar Docetaxel a la HSA se observó un desplazamiento en la longitud de onda de absorción máxima de la proteína, de 2 ± 1 nm y un decremento en la absorbancia (Figura 1B). Estos efectos son consistentes con lo reportado por Cheng y colaboradores¹⁸, aunque en dicho trabajo los efectos no fueron cuantificados. En este trabajo, el decremento en absorbancia se reporta como la relación del cambio en la absorbancia respecto de la concentración de Docetaxel, dA/dD , donde A es la absorbancia y D es la concentración de Docetaxel. Con la adición de Docetaxel a la HSA, el dA/dD observado fue de $-18,031 \pm 4,522 \text{ M}^{-1}$, la desviación estándar representa el error experimental asociado a la medición de al menos diez experimentos diferentes.

Para evaluar si la unión de Docetaxel a la HSA cambia en función del tiempo, se realizaron pruebas a diferentes tiempos de incubación. Se tituló la solución de HSA, 2 μM , con Docetaxel a concentraciones de 4 μM a 28 μM y el espectro de absorción se midió después de 0, 10 y 30 min de incubación. En ningún caso se observó cambio en el espectro de absorción de la proteína con el tiempo de incubación con Docetaxel, lo que sugiere que, aparentemente la unión Docetaxel-proteína es estable, al menos en el tiempo explorado.

Con la finalidad de determinar la concentración óptima de Docetaxel para observar un cambio en el espectro de absorción electrónica de la proteína HSA se exploraron concentraciones de Docetaxel, en el intervalo de 28 a 80 μM . En la figura 2A se observa que a partir de 50 μM de Docetaxel, la señal de absorción se satura (líneas sólidas). Por lo tanto, al substraer el espectro de Docetaxel en cada punto de la titulación se observa un decremento significativo en la absorbancia de la HSA, que no corresponde al efecto de Docetaxel, y que es un efecto secundario debido al hecho de que la absorbancia está saturada a estas concentraciones (Figura 2B). Por lo tanto, las concentraciones de Docetaxel óptimas a utilizar son de 4 a 28 μM , ya que concentraciones mayores pueden dar lugar a falsos positivos.

Para evitar la saturación de la señal de absorción se modificó la concentración de proteína y de Docetaxel haciendo una dilución 1:10. Al obtener las diferencias en el espectro de absorción de la proteína en presencia de Docetaxel se observa que el decremento en la absorbancia es muy pequeño, por lo que no es posible observar cambios en la absorbancia (Figura 3).

Otra alternativa para observar los efectos en la absorbancia sin modificar la concentración de proteína ni de Docetaxel es utilizar un paso óptico menor. Por lo tanto, se realizó la prueba utilizando diferentes pasos ópticos (0.2, 0.5 y 1 cm) con HSA en presencia de 28 μM de Docetaxel. En la figura 4 se observa que el paso óptico que conserva la longitud de onda, no satura la

señal y permite observar el efecto de la modificación de la proteína en presencia de Docetaxel es el de 0.5 cm.

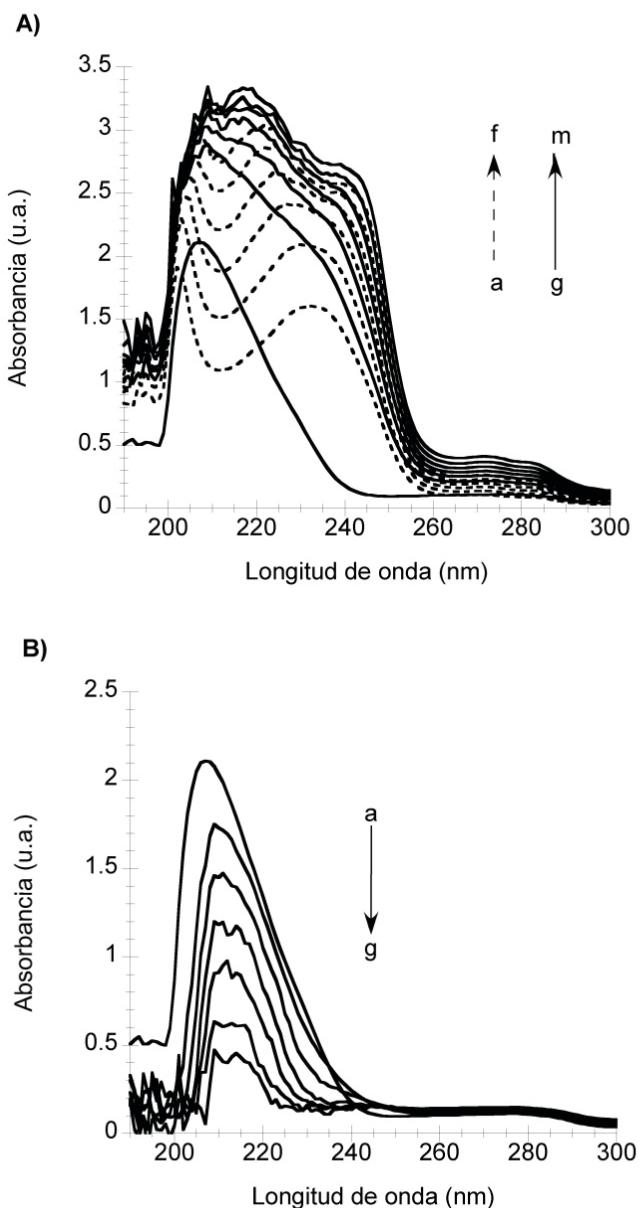


Figura 2. Espectros de absorción electrónica en la región UV-Vis de la HSA en presencia de Docetaxel (28-80 μM). A) Espectro de absorción de: Docetaxel a concentraciones crecientes (28, 40, 50, 60, 70, 80 μM), líneas punteadas (a f, respectivamente); HSA (2 μM), línea sólida (g); y HSA en presencia de concentraciones crecientes de Docetaxel (28, 40, 50, 60, 70, 80 μM), líneas sólidas (h m, respectivamente). B) Diferencia de espectros de absorción de la HSA (a, 2 μM) con Docetaxel menos el espectro de Docetaxel solo, a diferentes concentraciones del fármaco (b=28 μM , c=40 μM , d=50 μM , e=60 μM , f=70 μM , g=80 μM).

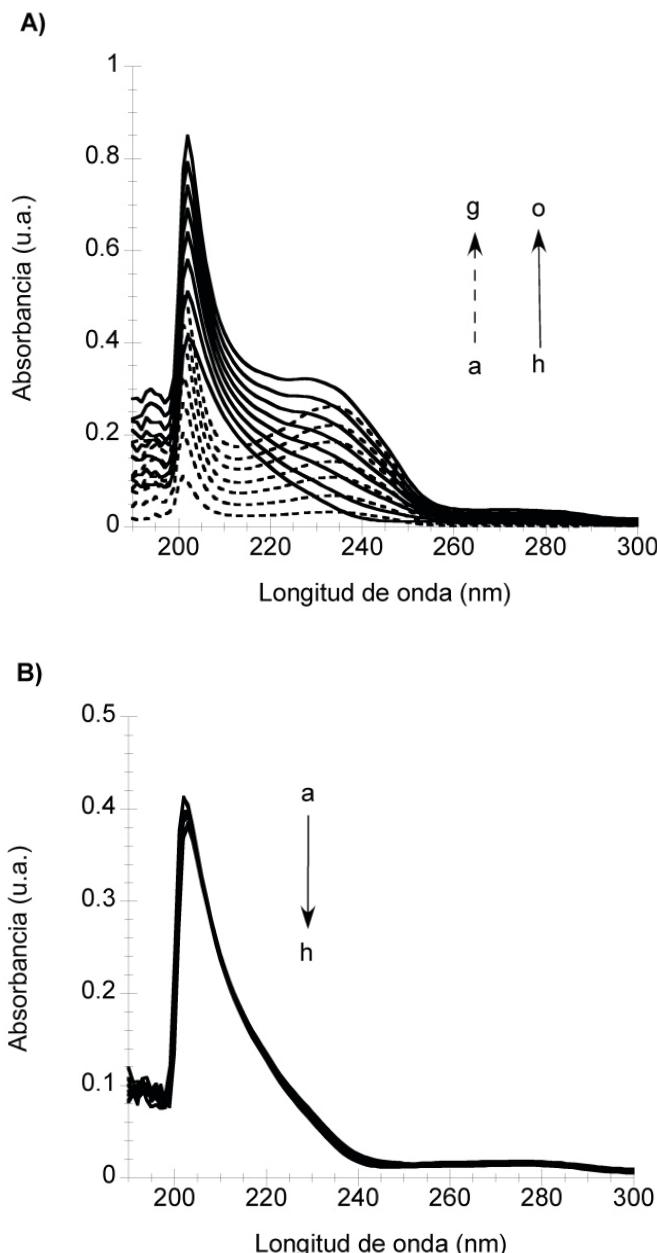


Figura 3. Prueba de dilución de la HSA en presencia de concentraciones crecientes de Docetaxel. A) Espectro de absorción de: Docetaxel a concentraciones crecientes (0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2, 2.4, 2.8 μ M), líneas punteadas (a→g, respectivamente); HSA (h=0.2 μ M), línea sólida (h); y HSA en presencia de concentraciones crecientes de Docetaxel (0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2, 2.4, 2.8 μ M), líneas sólidas (i→o, respectivamente). **B)** Diferencia de espectros de absorción de la HSA (a, 2 μ M) con Docetaxel menos el espectro de Docetaxel solo, a diferentes concentraciones del fármaco (b=0.4 μ M, c=0.8 μ M, d=1.2 μ M, e=1.6 μ M, f=2 μ M, g=2.4 μ M, h=2.8 μ M).

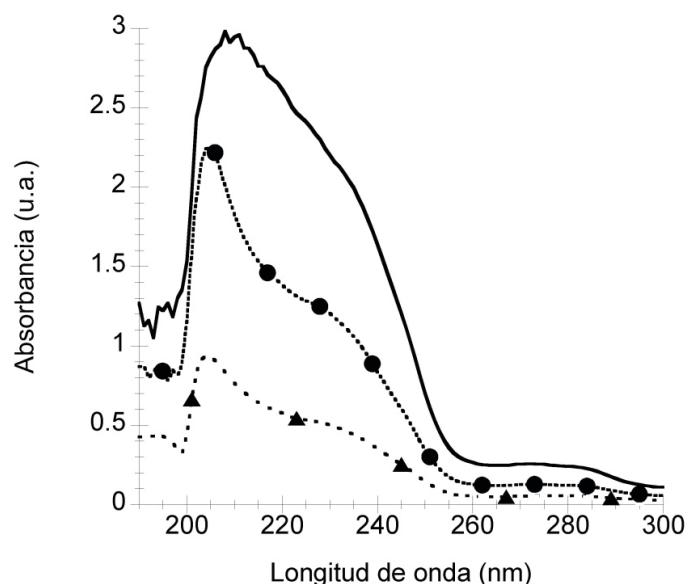


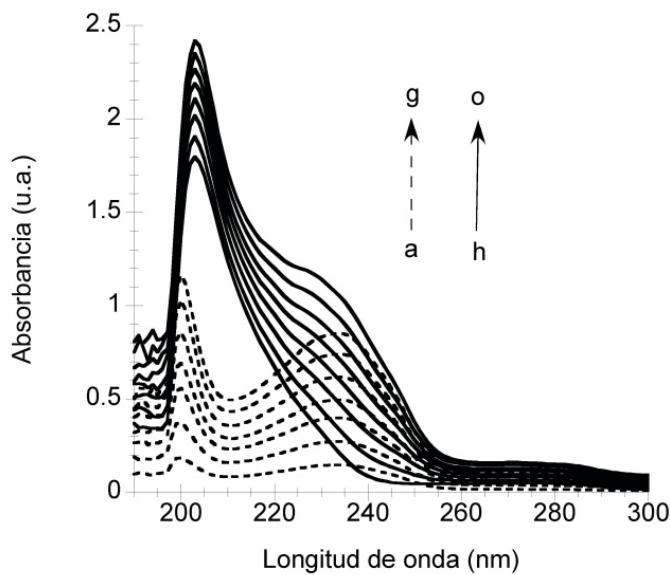
Figura 4. Prueba de unión de Docetaxel a HSA con diferentes pasos ópticos. Espectro de absorción electrónica de HSA (2 μ M) en presencia de Docetaxel (28 μ M) utilizando diferentes pasos ópticos: 0.2 (-Δ-), 0.5 (-O-) y 1 (-) cm.

En la figura 5 se muestran los espectros de absorción electrónica de la HSA obtenidos bajo las condiciones experimentales optimizadas. Los resultados muestran que al adicionar Docetaxel a la HSA, el dA/dD observado fue de $-14,445 \pm 2,945 \text{ M}^{-1}$, con un cambio en la longitud de onda máximo de $2 \pm 1 \text{ nm}$.

La implementación de espectroscopías como nuevas técnicas de estudio *in vitro* para la interacción fármaco-proteína muestra un nuevo panorama para caracterizar aquellos medicamentos que no siguen el proceso de bioequivalencia tradicional. La unión a proteínas plasmáticas es crítica y está involucrada en la manifestación de los efectos farmacológicos de Docetaxel y de medicamentos análogos.

La clave en la distribución de un fármaco es su unión a las proteínas plasmáticas, como la HSA, ya que representan un sistema de transporte y entrega de fármacos al sitio de acción. Por otro lado, es clave que las variaciones en las concentraciones plasmáticas de estas proteínas pueden alterar considerablemente la concentración del fármaco libre, aumentando sus efectos adversos, como sucede en el caso de Docetaxel. Con la prueba desarrollada y estandarizada en este trabajo, es posible evaluar la unión del Docetaxel a la HSA, y esto puede ser aplicado en la evaluación de diferentes formulaciones de Docetaxel.

A)



B)

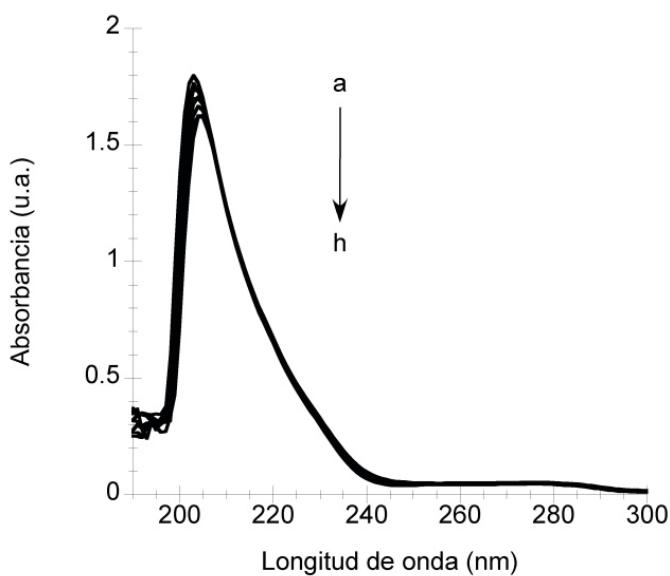


Figura 5. Espectros de absorción electrónica en la región UV-Vis de la HSA en presencia de Docetaxel (4-28 μM) con un paso óptico de 0.5 cm. A) Espectros de: Docetaxel a diferentes concentraciones (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 μM), líneas punteadas (a→g, respectivamente); HSA 2 μM, línea sólida (h); y HSA en presencia de concentraciones crecientes de Docetaxel (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 μM), líneas sólidas (i→o, respectivamente). B) Diferencia de espectros de absorción de la HSA (a, 2 μM) con Docetaxel menos el espectro de Docetaxel solo, a diferentes concentraciones del fármaco (b=4 μM, c=8 μM, d=12 μM, e=16 μM, f=20 μM, g=24 μM, h=28 μM).

Conclusiones

La espectroscopia de absorción electrónica constituye una herramienta útil para estudiar la unión fármaco-proteína por ser una técnica sensible, reproducible, precisa y de fácil acceso. La unión de Docetaxel a la HSA ocasiona un decremento en su absorbancia, el cual ha sido cuantificado en este estudio. Mediante absorción electrónica se evaluaron los coeficientes de extinción molar de Docetaxel y la interacción del fármaco con la proteína plasmática HSA, concluyendo que las condiciones experimentales óptimas para su estudio son de 4 a 28 μM de fármaco, 2 μM de proteína, sin necesidad de incubar los reactivos y utilizando un paso óptico de 0.5 cm. En el presente trabajo se evaluó la unión de la HSA al Docetaxel en presentación Taxotere, y en principio, la prueba aquí desarrollada usando absorción electrónica podría ser implementada para evaluar la unión de Docetaxel a la HSA cuando el fármaco se encuentra en diferentes formulaciones.

Agradecimientos

Se agradece a Sanofi-Aventis por la aportación de las unidades de Taxotere a este estudio, a CONACYT por el apoyo económico (beca a M.M y proyecto No.CB2009-128255 a LQ) y a Gabina Dionisio Cadena por su colaboración en este trabajo.

Referencias

1. Kolesar JM. Docetaxel in hepatic impairment. *J Oncol Pharm Practice*. 2000;6(2):43-9.
2. Vial J, Cohen M, Sassi P, Thiebaut D. Pharmaceutical quality of docetaxel generics versus originator drug product: a comparative analysis. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(7):2019-33.
3. Ng SS, Figg WD, Sparreboom A. Taxane-mediated antiangiogenesis in vitro: influence of formulation vehicles and binding proteins. *Cancer Res*. 2004;64(3):821-4.
4. Sparreboom A, Zhao M, Brahmer JR, Verweij J, Baker SD. Determination of the docetaxel vehicle, polysorbate 80, in patient samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;773(2):183-90.
5. Carstens MG, de Jong PH, van Nostrum CF, Kemmink J, Verrijk R, de Leede LG, Crommelin DJ, Hennink WE. The effect of core composition in biodegradable oligomeric micelles as taxane formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68(3):596-606.
6. Vasu Dev R, Moses Babu J, Vyas K, Sai Ram P, Ramachandra P, Sekhar NM, Mohan Reddy DN, Srinivasa Rao N. Isolation and characterization of impurities in docetaxel. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40(3):614-22.

7. Urien S, Barre J, Morin C, Paccaly A, Montay G, Tillement JP. Docetaxel serum protein binding with high affinity to alpha 1-acid glycoprotein. *Invest New Drugs*. 1996;14(2):147-51.
8. Bruno R, Riva A, Hille D, Lebecq A, Thomas L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of docetaxel: results of phase I and phase II trials. *Am J Health Syst Pharm*. 1997;54(24 Suppl 2):S16-9.
9. Baker SD, Li J, ten Tije AJ, Figg WD, Graveland W, Verweij J, Sparreboom A. Relationship of systemic exposure to unbound docetaxel and neutropenia. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77(1):43-53.
10. Ascoli GA, Bertucci C, Salvadori P. Ligand binding to a human serum albumin stationary phase: use of same-drug competition to discriminate pharmacologically relevant interactions. *Biomed Chromatogr*. 1998;12(5):248-54.
11. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng*. 1999;12(6):439-46.
12. Otagiri M, Chuang VT. Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(4):527-34.
13. Otosu T, Nishimoto E, Yamashita S. Multiple conformational state of human serum albumin around single tryptophan residue at various pH revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J Biochem*. 2010; 147 (2): 191-200.
14. Otagiri M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2005;20(5):309-23.
15. Ghuman J, Zunszain PA, Petipas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol*. 2005;353(1):38-52.
16. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human. Assessment Report for Docetaxel Teva. International Nonproprietary Name: Docetaxel. Procedure No.EMEA/H/C/1107.2010.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/001107/WC500073418.pdf. Acceso 21 Ene 2013.
17. Malleswara Reddy A, Banda N, Govind Dagdu S, Venugopala Rao D, Kocherlakota CS, Krishnamurthy V. Evaluation of the pharmaceutical quality of docetaxel injection using new stability indicating chromatographic methods for assay and impurities. *Sci Pharm*. 2010;78(2):215-31.
18. Cheng HX, Liu H, Zhang YY, Zou GL. Interaction of the docetaxel with human serum albumin using optical spectroscopy methods. *J Lumin*. 2009;129(10):1196-203.