

## FORMULATION ET STABILITE D'UNE SOLUTION DE LIOTHYRONINE 1,36 µg/ml POUR SUPPLEMENT DE MILIEU DE CULTURE CELLULAIRE

E. Diouf<sup>1</sup>, M.L. Tall<sup>1</sup>, M.C. Despiou<sup>2</sup>, O. Damour<sup>3</sup>, M. Moulsmas<sup>4</sup>, F. Pirot<sup>1,5</sup>, C. Pivot<sup>1</sup>

1: Pharmacie Hôpital Edouard Herriot, Lyon

2: Pharmacie C.H.N.O. des Quinze-Vingts, Paris

3: Banque de Tissus, Hôpital Edouard Herriot, Lyon

4: Laboratoire de Toxicologie, Hôpital Edouard Herriot, Lyon

5: Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, Faculté de Pharmacie, université Claude Bernard, Lyon

### INTRODUCTION

La liothyronine (T3) est une hormone thyroïdienne activatrice de la prolifération cellulaire. La banque de tissus de l'hôpital réalisait en interne une solution de liothyronine sodique à 1,36 µg/ml dans du PBS (Phosphate Buffered Saline).

La pharmacie a repris cette préparation avec une nouvelle formulation et étude de stabilité puisque la solution n'était pas stable dans le PBS.

L'objectif était de remplacer le PBS par une solution méthanolique de NaOH (50/50), de comparer la stabilité des deux solutions à -25°C et à +4°C et de fournir un produit de qualité pharmaceutique.

### MATERIELS ET METHODES

La solution de T3 sodique à 1,36 µg/ml dans le PBS et dans la solution méthanolique de NaOH a été préparée dans le respect des BPP sous isolateur par filtration stérilisante puis conditionnée dans des flacons ambrés remplis à 2 ml.

Les flacons sont conservés à -25°C et à +4°C et la liothyronine est dosée par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV DAD à J0, J7, M1, M2, M3, M4, M6, M9 et M12 puis à M24 pour les solutions conservées à +4°C.

La T3 dans la solution méthanolique de NaOH a été par ailleurs testée par la banque de tissus dans les milieux de culture pour étudier le potentiel prolifératif des cellules épithéliales en utilisant la technique de référence, la capacité des cellules épithéliales à former des colonies.

La cytotoxicité du méthanol pour les kératinocytes et fibroblastes a aussi été étudiée en comparant des concentrations de T3 à C, 2C, 3C à (i) un témoin positif: Le SDS de cytotoxicité (0,002% pour les fibroblastes et 0,01% pour les kératinocytes) et (ii) un témoin négatif ne comprenant que du milieu de culture pour fibroblastes ou du milieu de culture pour kératinocytes sans T3 qui sert à déterminer les 100% de viabilité.

### RESULTATS / DISCUSSION

La T3 était stable avec la solution méthanolique de NaOH conservée à -25°C et à +4°C jusqu'à M12.

La T3 dans le PBS était moins stable pour les deux conditions de conservation

A M24 la concentration de la T3 à +4°C avec la PBS est presque nulle alors que celle de la solution méthanolique de NaOH est très stable.

Ces résultats confirment la première étude de stabilité faite uniquement avec le PBS et qui montrait une baisse de la concentration au cours du temps pour les deux conditions de conservation.

La T3 avec la solution méthanolique de NaOH est plus stable à +4°C et permet ainsi un transport plus facile pour le maintien de la chaîne du froid qu'à une température de -25°C.

Les tests pour la viabilité et la prolifération des fibroblastes et des kératinocytes cultivés dans un milieu contenant la solution méthanolique de T3 étaient satisfaisantes (nombre de colonies: 42±6).

Aucune toxicité n'a été notée au niveau des cellules mises en culture avec la T3 dans la solution méthanolique de NaOH.

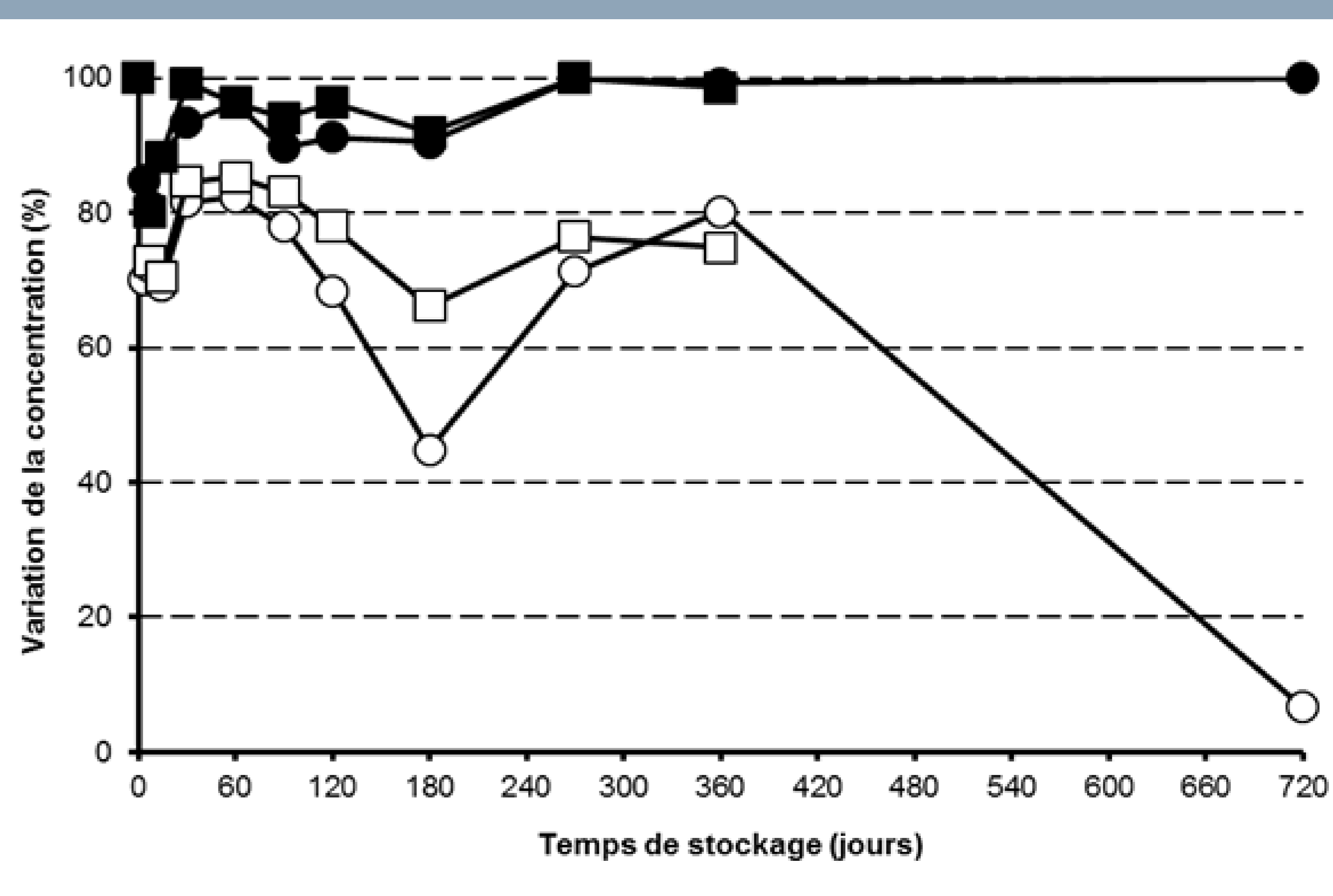


Figure 1:

Variation de la concentration de solutions de T3 1,36 µg/ml au cours du temps de stockage. Les solutions de T3 ont été conservées soit (i) à 4°C (● : solvant méthanol/hydroxyde de sodium) et (○ : solvant : PBS), soit (ii) à -25°C (■ : solvant méthanol/hydroxyde de sodium) et (□ : solvant : PBS).

### CONCLUSION

Cette étude a permis d'une part de confirmer l'instabilité de la solution de T3 sodique 1,36 µg/ml dans le PBS et d'autre part la stabilité de celle-ci dans une solution méthanolique de NaOH (50/50).

Les résultats de cette étude ont permis de lancer la préparation en routine de la liothyronine sodique avec la solution méthanolique de NaOH pour la banque de tissus en conformité avec les BPP et les exigences ANSM pour la culture des cellules.

### REFERENCES

1. ICH Q1A (R2): Stability testing of new drugs and products, 2003
2. Simon M, Green H. Enzymatic cross-linking of involucrin and other proteins by keratinocyte particulates in vitro. Cell. 1985 Mar;40(3):677-83