

A ciklodextrinek aggregációjának gyógyszerformulázási következményei

PUSKÁS István* és SCHROTT Mária

CycloLab Ciklodextrin Kutató Fejlesztő Laboratórium Kft.

Illatos út 7. 1097 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A ciklodextrinek (CD) hat, hét vagy nyolc α -D-glükopiranoz-egységből álló ciklikus oligoszacharidok. A glükopiranoz egységek számától függően α -, β -, illetve γ -CD néven ismerjük, ezek az ún. alap ciklodextrinek. A CD-k csonkakúp alakú, belső üreggel rendelkező nanoméretű molekulák. A szerkezeti elrendeződés következményeként ez az üreg apoláris; a molekula pereme és külső felülete poláris. A CD-k asszociációs típusú, ún. zárványkomplexeket képezhetnek különböző kémiai szerkezetű (elsősorban egy, vagy több apoláris csoportot tartalmazó) ionokkal, gyökökkel vagy molekulákkal, de klasszikus értelemben vett kémiai kötés közöttük általában nem jön létre. Megfelelő körülmények között a zárványkomplex könnyen disszociálhat, és ekkor a szabadabbá vált vendégmolekula visszanyeri eredeti fizikai-kémiai sajátosságait.^{1,2}

A Magyar Kémiai Folyóirat hasábjain első alkalommal 1978-ban jelent meg ciklodextrin témájú közlemény, melyben Szejtli József és munkatársai elemezték a CD-komplekxképzés színezékek spektrális sajátosságaira gyakorolt hatását, valamint javasolták e jelenség felhasználását CD-tartalmú oldatok analitikai vizsgálatára.³

A CD-k sajátosságait tárgyaló tudományos közlemények (cikkek, monográfiák) számtalosa hányszorosa kapcsolódik gyógyszeripari alkalmazáshoz,⁴ mert számos gyógyszermolekula alkalmas komplexképző partner a CD-k számára. A ciklodextrinnel történő komplexképzés egyik leggyakoribb velejárója, hogy a bezárt vegyület oldékony-sága vizes fázisban (akár sokszorososan) felülmúlhatja a komplexálatlan vegyületét. Sok kevéssé oldható hatóanyagból nehéz előállítani vizes közegű injektálható készítményt. További probléma lehet, ha az alkalmazandó vegyületek illékonyak, hő hatására elbomlanak, érzékenyek az oxidációra, fényre, bizonyos ionokra, illetve összeférhetetlenek más összetevőkkel. Ezekben az esetekben sikerrel alkalmazták a CD-ket gyógyszerformulázási segédanyagként. A CD-k alkalmazásán alapuló technológiai jellemzők javulása a vendégmolekulák CD komplexen belüli molekuláris szintű diszperz állapotával indokolható. A kialakuló komplex egésze hidrofili kémiai karakterű lesz, és a hatóanyag védett mikroölymézet biztosítja.

Ciklodextrinnel célszerűen szabályozhatók egyes hatóanyagok farmakokinetikai jellemzői is.⁵ A forgalomba kerülő ciklodextrin-farmakon komplexeket tartalmazó gyógyszerkészítmények jelentős része tabletta, kapszula, illetve drázsé formában kerül kiszervezésre.⁶ Ilyen készítmények kritikus jellemzője a hatóanyag(ok)

felszabadulási és oldódási sebessége, valamint a biológiai felszívódás mértéke.

A vízben rosszul oldódó farmakonok biológiai hasznosulása gyakran csekély mértékű. A hatóanyag azonban jól oldódó ciklodextrin zárványkomplexéből gyomornedvvel érintkezve percekben belüli felszabadulhat, valamint a felszívódás szempontjából kedvező magas szabad farmakon-koncentráció hosszú ideig biztosítható. A hidrofili komplex asszociátum, valamint maga a CD gyakorlatilag nem szívódik fel a tápcsatornából.⁷

További előnyös sajátossága is lehet a CD-komplekxbe zárt farmakonoknak. A gyógyszerhatóanyagok jelentős része kellemetlen ízű vagy szagú, alkalmazásuk súlyos mellékhatással járhat, irritálhatja a gyomorfalat vagy a nyálkahártyát. A problémák részleges vagy teljes megoldását a hatóanyag CD-be történő bezárása kínálja.⁸

Kedvező komplexképző tulajdonságaik, jó vízoldhatóságuk és csekély aggregációs hajlamuk miatt számos forgalomban lévő gyógyszerészeti készítményben alkalmaznak kémiaiilag módosított ciklodextrin-származékokat is, például 2-hidroxipropil- β -ciklodextrint (HPBCD), és szulfobutiléter- β -ciklodextrint.⁹ E termékek túlnyomó többsége parenterális készítmény vagy szemcsepp, melyekkel szemben szigorú hatósági követelményeket támasztanak. Ezek közül kiemelendő, hogy szemmel detektálható részecskék nem lehetnek jelen a termékben. E formulációk fejlesztésekor az aggregációs sajátosságok vizsgálatának kiemelt jelentősége van, mivel az aggregátumok a hatóanyag kicristályosodásának gócai lehetnek.

A ciklodextrinek komplexképző sajátossága kedvezően felhasználható biológiai aktivitást mutató makromolekulák és peptidok stabil, injektálható vizes oldatainak előállítására.¹⁰ Kiemelkedő gyógyászati jelentőségű, de alacsony oldékony-ságú, idővel aggregáló polipeptideket pl. interleukin-2-t (IL-2); tumor nekrozis faktort (TNF), makrofág kolónia stimuláló faktort (M-CSF), inzulint és eritropoietint (EPO) tartalmazó vizes oldatok hosszabb ideig tárolhatók, ha adalékanyagként HPBCD-t is tartalmaznak. A stabilitásnövekedés ugyanakkor nem csökkenti a polipeptid oldatok biológiai hasznosulási arányát.¹¹

A CD-k gyógyászati felhasználása jelentős paradigmaváltáson ment keresztül a 2000-es évek fordulóján, miután gyakorlati alkalmazást is nyert a felismerés, hogy bizonyos CD-származékok önmagukban is alkalmas vegyületek orvosi kezelés céljára. A CD-kutatás történetének ezen izgalmas

* Tel.: (1) 347 60 77; fax: (1) 347 60 68; e-mail: puskas@cyclolab.hu

fejlesztet Szente Lajos foglalta össze e folyóirat egy évvel korábbi számában.¹²

2. A ciklodextrinek és komplexeik aggregációs viselkedése

A CD-kből készült vizes oldatok ideálistól eltérő ozmózisnyomás-adataiból számolt aktivitási együtthatók alapján japán kutatók már az 1980-as évek elején feltételezték, hogy ezen oligoszacharid molekulák önszerveződésre (legalábbis dimer képzésére) hajlamosak.¹³

A műszeres vizsgálati lehetőségek szélesedő tárházának (pl. az új fényszórásos technikák, atomerő mikroszkópia (AFM), elektron-spin rezonancia (ESR) spektroszkópia, stb.) bővülésével, és az egyre érzékenyebb módszerek elérhetővé válásával az intermolekuláris kölcsönhatások részletesebb jellemzésére nyílt lehetőség.^{14,15} Az aggregátumok méreteloszlásának és stabilitásának vizsgálata gyakorlatban is kiaknázható eredményeket szolgáltatott a gyógyszerfejlesztő szakemberek számára.

Az 1990-es években több közlemény is foglalkozott azzal a felismeréssel, hogy számottevő különbség lehet az alap CD-k, illetve származékaik aggregációs hajlama között. Az alap CD-k vizes oldatban meglehetősen hajlamosak aggregációra, az aggregált részecskék átmérője akár a néhány mikrométert is elérheti.¹⁶ Különösen figyelemreméltó, hogy a gamma-ciklodextrin akár néhány százalékos vizes oldata napokon belül szabad szemmel is látható opaleszcenciát mutat és ülepedő diszperz rendszert képez.¹⁷

Hidrofil CD-származékok kevésbé aggregálnak, mint a megfelelő alapvegyület, mivel a CD-molekulák peremén található -OH csoportok teljes vagy részbeni szubsztitúciója miatt csökkenhet az intermolekuláris hidrogénhidak létrejöttének lehetősége.¹⁸ Amennyiben hidrofób oldallánccokat építünk a CD-molekulákra, a vízben való oldékonyság csökkenése mellett vizes oldatukban az aggregáció mértékének növekedésére számíthatunk.^{19,20}



1. Ábra. Polimerrel stabilizált ciklodextrin-hatóanyag komplex sematikus ábrázolása.

A ciklodextrinek aggregációra való hajlama (alkalmas körülmények között) gyógyszerformulálási szempontból akár előnyös is lehet. Nanoméretű CD- vagy CD-komplex aggregátumok vizsgálható polimerekkel szterikusan

stabilizálhatók. A polimer burokkal védett aggregátumok további összeépülésre már nem hajlamosak, a polimerekkel stabilizált aggregátumok inkább az asszociációs kolloid rendszerekkel mutatnak szerkezeti analógiát (ld. 1. ábra). Ilyen típusú formulációkat a gyakorlatban vizes közegben melegítéssel, majd visszahűtéssel állítanak elő. A gyógyszerészet mellett a kozmetikum-, illetve növényvédőszer-formulálás során is használható eljárás szabadalmi oltalomban is részesült.²¹

Jelen közleményben néhány saját (a Cyclolab Kft-nél elvégzett) ciklodextrin-aggregációs vizsgálatot mutatunk be.

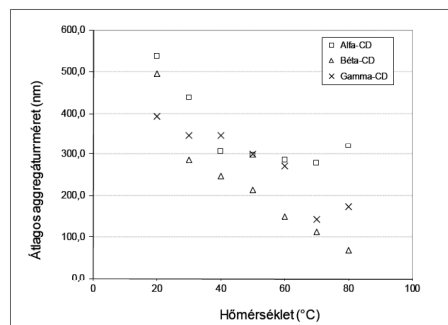
3. Vizsgálati módszer

Az aggregátumok méreteloszlását Malvern Zetasizer Nano ZS készülékkel (Malvern Instruments Ltd, Egyesült Királyság), dinamikus fényszórás mérés (fotonkorrelációs spektroszkópia) módszerrel vizsgáltuk. A készülék lézertörőse 633 nm-es HeNe lézer, a folyadéktartó 1,00 × 1,00 cm méretű üvegtüvegváza volt. A részecskeméret-eloszlásokat közvetlenül a készülékből nyert autokorrelációs függvényekből Zetasizer Software 6.2 verziójú szoftverrel értékeltük.

A folyadék mintákat közvetlenül vizsgálat előtt precíziós, szőtt, egyszálú, 10 µm-es névleges résméretű szitászöveten (Medifab, SEFAR AG, Svájc) szűrtük a szemmel érzékelhető lebegő szennyeződések eltávolítása végett.

4. Felhasznált anyagok

A kísérletek során használt ciklodextrinek a CycloLab Ciklodextrin Kutató Fejlesztő Laboratórium Kft. (Budapest, Magyarország) termékei. Adalékanyagokként a Molar Chemical (Budapest, Magyarország) p.a. minőségű finomvegyszereit használtuk fel.



2. Ábra. Az aggregátméret változása a hőmérséklet függvényében az alap CD-k vizes oldataiban (a kísérleti adatok hibahatára: ± 20 nm).

5. Eredmények

Különböző CD molekulák aggregációját vizsgáltuk a hőmérséklet függvényében. A három, leggyakrabban

alkalmazott (ún. alap) CD vizes oldatában lévő aggregátumok fényszórással meghatározott méretét a 2. ábrán mutatjuk be. A CD-k koncentrációit úgy választottuk meg, hogy azok közel legyenek a telítési értékhez, mivel leggyakrabban ilyen oldatokat alkalmazunk preparatív célú komplexképzés során, amennyiben oldat fázisú technikát választunk. Mindhárom esetben azt tapasztaltuk, hogy az átlagos aggregátumméret – némileg elért mértékben – csökken a hőmérséklet emelkedésével. A vizsgált hőmérséklet-tartományban egyik esetben sem értük el a teljes mértékű de-aggregációt, azaz a hőmozgás kinetikai energiája még 80 °C körül sem elegendő, hogy e CD-molekulák összekapcsolódását megakadályozza.

A CD-k aggregációs állapotának vizsgálatából nyert adatok nemcsak gyógyszer technológiai fejlesztések során használhatók. Az élettudományok és a biotechnológia jónéhány területén alkalmaznak CD-eket elsősorban szolubilizálószerként, illetve sejtmembrán-összetétel módosító ágenseként. A szolubilizált gyógyszer molekulák

fizikai állapota jelentős hatással lehet e szállítást végző („carrier”) molekulák hatékonyságára, és a megcélzott terület elérhetőségére is az ún. „fokozott permeabilitás és visszatartás” hatás miatt.²² Nanoméretű részecskéket tartalmazó gyógyszerformulációk alkalmazásával a nehezen átjárható biológiai gátrendszereken keresztül is átjuttatható a kívánt hatóanyag.^{23,24} Az 1. táblázatban biológiai alkalmazásokban gyakran alkalmazott adalékanyagok (hidrogénhid kötést perturbáló karbamid, makromolekulák, savak) és koszolvensek hatását vizsgáltuk alap β - és γ -CD-k, és egy kiválasztott szövetbarát, alacsony toxicitású CD-származék (HPBCD) aggregációjára. Annak felderítésére végeztük el a vizsgálatokat, hogy pusztán ezen adalékanyagok alkalmazásával célzottan módosíthatók-e a CD-k aggregációs sajátosságai.

A vizsgált adalékanyagok és koszolvensok de-aggregáló hatása kétféleképp nyilvánulhat meg. Egyfelől az aggregátumok mérete csökkenhet, vagy az aggregátumok mennyisége csökken változatlan átlagos átmérő mellett.

1. Táblázat Különböző sajátosságú segédanyagok és koszolvensok hatása a ciklodextrinek aggregációs sajátosságaira (25 °C)

Ciklodextrin	Segédanyag / koszolvens (koncentráció)	Hatás
β -ciklodextrin	citromsav (0,1 – 1,0 %)	De-aggregáló hatás
	citromsav (0,1 – 1,0 %) 80 °C-ra melegítés, majd 25°C-ra visszahűtés után	Jelentős de-aggregáló hatás
	dimetil formamid (0,1 – 1,0 %)	De-aggregáló hatás
	karbamid (1,0 %)	Nincs hatással az aggregációra
	dimetil szulfoxid (1,0 %)	Nincs hatással az aggregációra
	polivinil pirrolidon K-30 (0,1 %)	De-aggregáló hatás
γ - ciklodextrin	citromsav (0,1-1,0 %)	Aggregáló hatás
	karbamid (1,0 %)	Nincs hatással az aggregációra
	dimetil formamid (1,0 %)	Nincs hatással az aggregációra
	polivinil pirrolidon K-30 (1,0 %)	De-aggregáló hatás
	1,0% citromsav / citrát puffer (pH=6)	
2-hidroxi-propil- β - ciklodextrin, átlagos szubsztitúciófok: ~ 4	NaCl (0,9 %)	
	KH ₂ PO ₄ (1,0 %)	
	EDTE (1,0 %)	
	Foszfát pufferelt sóoldat (PBS)	
	bórsav (1,0 %)	
	arginin (1,0 %)	
	fruktóz (5,0 %)	
	glicerin (1,0 %)	
	etanol (1,0-15 V%)	
	nátrium tetraborát (1,0 %)	Aggregáló hatás
	polivinil pirrolidon K-17 (1,0 %)	De-aggregáló hatás
polivinil pirrolidon K-17 (1,0 %) + etanol (5,0-20 V%)	Jelentős de-aggregáló hatás	

Citromsav jelenlétében a β -CD aggregációra való hajlama csökken, különösen melegítés hatására. Azonban meglepő módon ellenkező hatást tapasztaltunk γ -CD esetében. Nagy töménységben alkalmazott karbamid hidrogénhid-kötésekre gyakorolt hatása közismert, az oldatbeli CD-k de-aggregációját is okozhatja.^{17,25,26} Az általunk alkalmazott alacsonyabb (1,0%) koncentrációban még az

érzékeny dinamikus fényszórásméréssel sem tapasztaltunk szignifikáns aggregációbeli változást.

Egy széles körben használt makromolekuláris adalékanyag – a polivinil-pirrolidon (PVP) – jelentékeny de-aggregáló hatását figyelhettük meg mindhárom vizsgált CD esetén. E makromolekulák gombolyagmérete fényszórásméréssel

10-20 nm-nek adódott, ami legalább egy nagyságrenddel kisebb, mint a CD-aggregátumok jellemző mérete. Emiatt a polimer molekulákról szóródó fény nem zavarta az aggregációs vizsgálatok értékelését. PVP jelenlétében azt tapasztaltuk, hogy az adalékanyagmentes CD-olatokra jellemző mérettartományban nem, vagy alig észlelhetők aggregátumok. Pusztán a fényszórásos vizsgálatok alapján azonban nem adható válasz arra, hogy a polimer gombolyagok méretével összemérhető, vagy annál kisebb CD-aggregátumok (esetleg a polimer által stabilizált formában) továbbra is léteznek-e az oldatban. A vizsgálat során használt PVP-k molekulatömegét úgy választottuk meg, hogy engedélyezési szempontból igazodjon a CD-k felhasználási területéhez. A *per os* alkalmazott β - és γ -CD aggregációs vizsgálatai során orális alkalmazásra javasolt magasabb molekulatömegű (K-30 jelű) mintát, míg az elsősorban parenterális célra használt HPBCD mellé injektábilis PVP K-17 jelű anyagot választottunk.

Mindkét PVP minta hatékony adalékanyagként bizonyult a CD-k önaaggregációjának megakadályozására. PVP K-17 és HPBCD esetében vizsgáltuk etanol koszoslvas hatását is. Az önmagában de-aggregációt nem okozó etanol PVP jelenlétében a polimer de-aggregáló hatását jelentősen fokozta.

A mérési eredményeinkből levonható tapasztalatok összhangban vannak Messner és munkatársainak membránpermeációs adatokból levont következtetéseivel, miszerint polimer adalékanyagokkal (karboximetilcellulóz, hidroxipropilmetilcellulóz), valamint etanollal lehetséges csökkenteni hatóanyag/ciklodextrin komplex aggregátumok méretét.²⁷

6. Összefoglalás

Fotonkorrelációs spektroszkópia alkalmazásával többféle ciklodextrin aggregációs sajátosságait vizsgáltuk vizes oldatban. Különböző közegekben összehasonlítottuk az alap ciklodextrinek és egy ciklodextrin származék (2-hidroxipropil-beta-ciklodextrin) önszerveződését. Részecskeméret elemzéseink alapján megállapítottuk, hogy szokásos adalékanyagok alkalmazásával (pl. citromsav, polivinil-pirrolidon), illetve a hőmérséklet változtatásával kontrollálható a ciklodextrin molekulák aggregációra való hajlama.

Pharmaceutical use of cyclodextrins: advantages and disadvantages of self-assembly

It has been known that cyclodextrin (CD) molecules are susceptible to self-association since the 1980's when Miyajima et al. reported their observations on the non-ideal osmotic behavior of CD-solutions.¹³ This phenomenon can cause problems in parenteral drug formulations.

As various modern, sensitive instrumental analysis techniques (laser light scattering, atomic-force microscopy, electron microscopy) were developed, in-detail data on the characterization

Hivatkozások

- Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, **1988**.
- Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1754.
- Szejtli, J.; Budai, Zs.; Kajtar, M. *Magyar Kémiai Folyóirat* **1978**, *84(2)*, 68-78.
- Fenyvesi, E.; Tuza, K., *Cyclodextrin News* **2016**, *30(1)*, 1-4.
- Fróming, K-H.; Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, **1994**.
- Fenyvesi, E. *Cyclodextrin News* **2013**, *27(2)*, 1-4.
- Committee for Human Medicinal Products (CHMP)/EMA/CHMP/333892/2013 **2014**, 1-17.
- Szejtli, J.; Szenté, L. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *61*, 115-125.
- Szenté, L.; Szejtli, J. *Adv. Drug Del. Rev.* **1999**, *36*, 17-28.
- Brewster, M. E.; Simpkins, J. W.; Hora, M. S.; Stern, W. C. *J. Parenter. Sci. Technol.* **1989**, *43(5)*, 231-240.
- Konings, F. J.; Noppe, M. J. M.; Mesens, J. L. Európai szabadalmi bejelentés EP513072, **1992**.
- Szenté, L. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2015** *121(1)*, 34-38.
- Miyajima, K.; Sawada, M.; Nakagaki, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, *56*, 3556-3560.
- Bonini, M.; Rossi, S.; Karlsson, G.; Almgren, M.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. *Langmuir*. **2006**, *22*, 1478-1484
- Rossi, S.; Bonini, M.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. *Langmuir*. **2007**, *23*, 10959-10967.
- Coleman, A.W.; Nicolis, I.; Keller, N.; Dalbiez, J.P. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1992**, *13*, 139-143.
- Szenté, L.; Szejtli, J.; Kis, G. L. *J. Pharm. Sci.*, **1998**, *87(6)*, 778-781.
- González-Gaitano, G.; Rodríguez, P.; Isasi, J.R.; Fuentes, M.; Tardajos, G.; Sánchez, M. J. *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 101-105.
- Raffaini, G.; Mazzaglia, A.; Ganazzoli, F. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2015**, *11*, 2459-2473.
- Lombardo, D.; Longo, A.; Darcy R.; Mazzaglia, A. *Langmuir*, **2004**, *20(4)*, 1057-1064.
- Lofsson, T. egyesült államokbeli szabadalom, **1992**, US5472954.
- Owen, S. C.; Doak, A. K.; Wassam, P.; Shoichet, M.S.; Shoichet, B.K. *ACS Chem Biol.* **2012**, *7(8)*, 1429-1435.
- Kürti, L.; Gáspár, R.; Márki, Á.; Kápolna, E.; Boesik, A.; Veszelka, S.; Bartos, C.; Ambrus, R.; Vastag, M.; Deli, M.A.; Szabó-Révész, P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50*, 86-92.
- Singh, R.; Lillard, J. W. *Exp Mol Pathol.* **2009**, *86(3)* 215-223.
- Hinze, W. L.; Pharr, D. Y.; Fu, Z. S.; Smith, T. K. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 275-277.
- Coleman, A. W.; Munoz, M.; Chatjigakis, A. K.; Cardot, P. *J. Phys. Org. Chem.* **1993**, *6*, 651-659.
- Messner, M.; Kurkov, S.V.; Maravér Palazón, M.; Álvarez Fernández, B.; Brewster, M. E.; Lofsson, T. *Int. J. Pharm.* **2011**, *419(1-2)*, 322-328.

of intermolecular interactions became available. In the 1990's several publications dealt with the peculiarity of hydrophilic CD-derivatives, that these compounds are less likely to form aggregates compared to the starting material parent CDs.^{14,16} Szenté et al. conducted extensive investigations on the aggregation properties of gamma-CD which shows opalescence in aqueous solution even in few percentage concentration.¹⁵

Ability to control the aggregate state of CDs offers multiple benefit for the pharmaceutical technologists. On one hand aggregation phenomenon in injectable and ophthalmic preparations is often sought to be eliminated since such aggregates might be seeds

for the precipitation of the solubilized drug. However, if such nanosized associates are kinetically stabilized by water soluble polymer chains, then the apparent solubility of some drugs difficult to formulate might be increased manifold.¹⁹ Such systems are prepared by heating and cooling cycles and might be well utilized in pharmaceutical, cosmetic and agrochemical applications.

In present work photon correlation spectroscopy has been employed for the purpose of characterizing the aggregation behavior of CD molecules. Parent cyclodextrins and a cyclodextrin derivative, (2-hydroxy)propyl- β -cyclodextrin (HP β CD) were studied in different aqueous media. Based on particle size analysis data we have demonstrated that the tendency of cyclodextrin molecules to form aggregates may be controlled by both temperature and numerous additives. Cyclodextrins are used in various pharmaceutical and life science fields as solubilizers and membrane-composition modifiers. The aggregate state of these carrier molecules may affect or modify the performance of cyclodextrin-drug associates as well as the availability to the targeted tissues.

The changes of the mean aggregate sizes as functions of temperature (between 20 and 80 °C) were evaluated. Nearly saturated solutions prepared from the three parent CDs were evaluated, since we aimed modeling the circumstances applied upon liquid phase complex preparation. It was found that the aggregate sizes decrease by increasing the temperature in the studied range, but complete deaggregation could not be reached. The reduction of the mean sizes somewhat differed comparing the three parent CDs. It could be seen that increasing the kinetic energy of the individual cyclodextrin molecules may disrupt the aggregate architecture.

Eventual aggregative or anti-aggregative effect of representative compounds of distinct chemical properties (hydrogen bond breakers/modifiers, macromolecules, acids, cosolvents) present as additives was also studied. When anti-aggregative effect was

observed, usually also the intensity of the scattered light attributed to the aggregates was found to decrease besides the reduction of the mean size.

Some additives behaved differently if the preparation of the solution was followed by heat treatment: citric acid caused de-aggregation of β -CD especially when the solution was heated to elevated temperature. Surprisingly citric acid affected the aggregation behavior of γ -CD in a controversial way at room temperature. Urea has earlier been reported to deaggregate β -CD due to its ability to affect the intermolecular hydrogen-bond network of the CD, however, this effect was only significant in somewhat concentrated solutions (i.e. above 1 M). We have observed that urea applied in dilute solution (1.0 w%) is practically inefficient.

A polymeric additive – polyvinylpyrrolidone (PVP) – widely used in the pharmaceutical formulations showed anti-aggregation effect. Solvated PVP macromolecules being in a coiled up conformation scatter light themselves, but their size (10-20 nm) is smaller at least by one order of magnitude than that of the typical CD aggregates. The deaggregation of CD molecules was recorded as the particle population falling within the range characteristic to CD-associates was less or no longer detectable in the presence of PVP. Due to practical applicability purposes the effect of a higher molecular mass PVP suitable for *per os* use (K-30) was evaluated when anti-aggregation of β -CD or γ -CD was studied whereas HP β CD was investigated in the presence of PVP K-17 which represents the grade of highest molecular mass still allowed for parenteral administration. Both PVP samples proved to be an effective additive to prevent the self-aggregation of β -CD, γ -CD and HP β CD. The de-aggregative effect of lower molecular mass PVP could be enhanced by using ethanol as a cosolvent.

Based on the presented results it is anticipated that further exploration of the characteristic aggregation state of cyclodextrins may find its relevance in pharmaceutical and biological applications.