

Certificate of Analysis

Date: December 11, 2023
Client: Pharmatoka
Project Code: PT230224
Assay: Anti-Adherence Assay
 P-Type Testing
 Type 1 Testing

Testing performed by Complete Phytochemical Solutions LLC

Samples were tested for *in vitro* bacterial anti-adhesion activity (AAA) on a per weight basis. Samples were suspended (60 mg/ml) in PBS, diluted serially (2-fold), and tested for bacterial anti-adhesion activity utilizing a modified hemagglutination assay specific for uropathogenic *E. coli* (Bosley et al., 2023). The concentration at which hemagglutination activity was suppressed by 50% (Minimum inhibitory concentration – MIC) was recorded as an indicator of the strength of the bacterial anti-adhesion activity (AAA). Anti-adhesion assays were repeated two times and the results averaged. Controls included wells containing bacteria + PBS, Red Blood Cells (RBC) + PBS, bacteria + test compound, RBC + test compound, and bacteria + RBC.

Sample Description	CPS Sample Code	Product #	Lot #	AAA (mg/mL)
Atocaps 90 caps/Diadom France	CS04670	N/A	USD2202	0.23

The final concentration at which anti-adhesion activity could be detected was recorded above. The smaller the AAA number, the greater the *in vitro* activity.

Anti-Adhesion Scale for AAA testing:

- Negative activity (>60 mg/mL)
- Low activity (60-15 mg/mL)
- Medium activity (7.5-0.47 mg/mL)
- High activity (0.23-0.06 mg/mL)


 Scott Bosley, MS
 Scientist, Complete Phytochemical Solutions

Results of this report refer only to the sample(s) tested and as they were received. This certificate shall not be reproduced, except in its entirety, without the written approval of Complete Phytochemical Solutions, LLC.

This COA includes updated AAA Scale to align with Bosley et al., 2023

REFERENCE

Bosley S, Krueger CG, Birmingham A, Howell AB, & Reed JD (2023). Improved *in vitro* hemagglutination assays utilizing P-type and Type 1 uropathogenic *Escherichia coli* to evaluate bacterial anti-adhesion activity of cranberry products. *Journal of Dietary Supplements*, DOI: 10.1080/19390211.2023.2276962



ATTESTATION

Bioactivité de l'extrait Gikacran® et des gélules Atocaps®

Depuis le début de la production de l'extrait Gikacran® (en 2013), tous les lots ont été systématiquement testés pour leur bioactivité, c'est-à-dire leur Activité d'Anti-Adhésion bactérienne (**AAA**). Ce test était historiquement effectué par le Dr Amy Howell, Marucci Center for Blueberry and Cranberry Research, Université de Rutgers (New Jersey, USA), en utilisant un modèle *in vitro* d'hémagglutination spécifique pour les bactéries *E. coli* avec P-fimbriae (test HRBC).

Début 2023, les tests d'AAA ont été transférés au laboratoire Complete Phytochemical Solutions (CPS) à Cambridge (Wisconsin, USA). La méthode a été entièrement harmonisée entre les deux laboratoires et les résultats ont été vérifiés. Les tests sont effectués dans un laboratoire de biosécurité de niveau 2, une certification spéciale qui permet d'effectuer des tests avec des bactéries pathogènes et des produits sanguins humains et animaux.

CPS a apporté plusieurs améliorations à la méthode de Rutgers (*Foo et al., 2000a¹* ; *Howell et al., 2005²* ; *Howell et al., 2022³*), incluant la présentation de données photomicrographiques pour permettre une plus grande précision dans la détermination des résultats ainsi qu'une meilleure visualisation – (**Fig. 1** cf *Bosley et al., 2023*).

L'extrait Gikacran® contenu dans AtoCaps® est utilisé comme standard de référence dans les tests d'AAA compte tenu de ses données historiques et reproductibles.

La concentration finale à laquelle une activité d'hémagglutination a pu être détectée (Concentration Minimale Inhibitrice - CMI) est enregistrée comme indicateur de la force de l'AAA bactérienne (étoile jaune dans la **Fig. 1**).

Plus le résultat de CMI est bas, plus l'activité *in vitro* est importante selon l'échelle suivante :

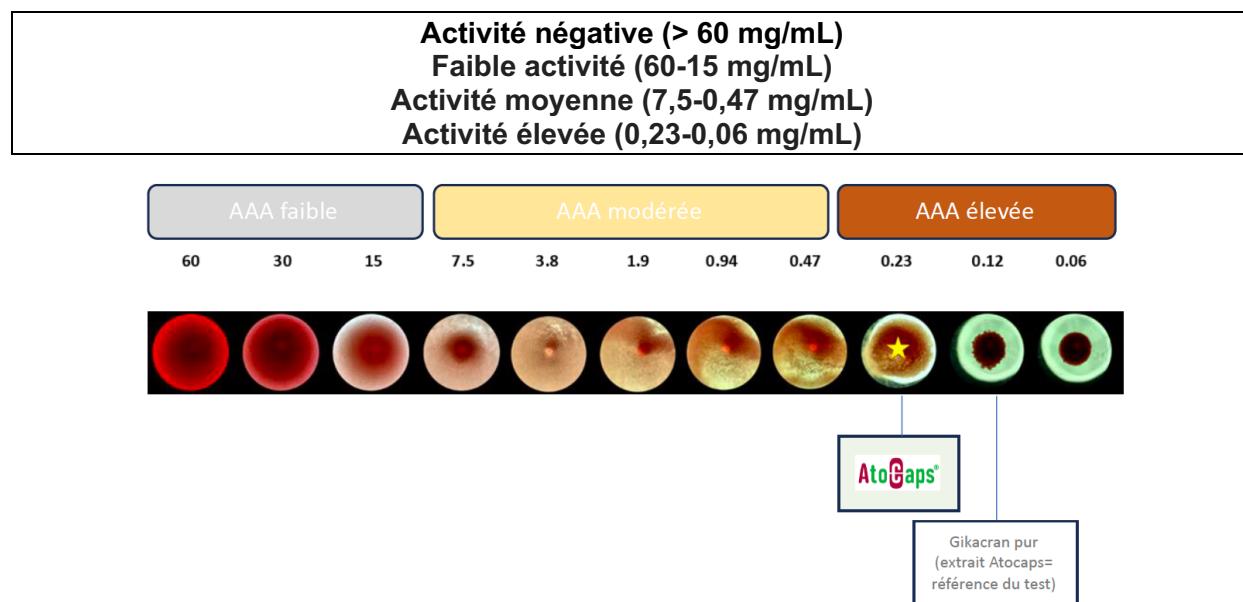


Fig.1





AtoCaps® et Gikacran® ont une AAA « élevée » contre *E. coli* de type P sur l'échelle d'AAA, dans la fourchette de 0,23 à 0,06 mg/ml. En effet, AtoCaps® apporte uniquement des PACs solubles provenant de Gikacran® (extrait de jus de canneberge), ce qui lui confère un haut niveau d'AAA.

Il convient de noter que la présence d'excipients (environ 25 %) dans les gélules AtoCaps® entraîne une concentration plus faible de PAC par unité de poids par rapport à l'extrait Gikacran® seul, ce qui explique une AAA légèrement inférieure sur l'échelle, environ 1 dilution de moins.

Les poudres de baies entières et les autres produits qui sont un mélange de poudre de jus et de marc ont une AAA « moyenne » sur l'échelle, avec des valeurs de CMI généralement comprises entre 7,5 et 0,47 mg/mL.

En comparaison, les poudres de canneberge à base de marc (peaux, pulpe et graines) ont une AAA réduite *in vitro* car les PACs sont liés à la cellulose et sont peu solubles (Howell et al., 2022³). Les produits à base de marc de canneberge ont une AAA « faible » sur l'échelle, avec des valeurs de CMI généralement comprises entre 60 et 15 mg/mL.

Ce test d'AAA n'est pas un test de libération mais est considéré comme un test informatif, afin de pouvoir communiquer sur l'efficacité *in vitro* d'AtoCaps® et de comparer les produits du marché entre eux.

¹ Foo, L. Y., Lu, Y., Howell, A. B., & Vorsa, N. (2000a). A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated Escherichia coli. *J Nat Prod*, 63(9), 1225-1228.

² Howell, A. B., Reed, J. D., Krueger, C. G., Winterbottom, R., Cunningham, D. G., & Leahy, M. (2005). A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*, 66(18), 2281-2291.

³ Howell AB, Dreyfus JF, Chughtai B. Differences in Urinary Bacterial Anti-Adhesion Activity after Intake of Cranberry Dietary Supplements with Soluble versus Insoluble Proanthocyanidins. *J Diet Suppl*. 2022;19(5):621-639. doi: 10.1080/19390211.2021.1908480. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33818241.

⁴ Scott Bosley, Christian G. Krueger, Andrew Birmingham, Amy B. Howell & Jess D. Reed (14 Nov 2023): Improved *in vitro* Hemagglutination Assays Utilizing P-Type and Type 1 Uropathogenic Escherichia coli to Evaluate Bacterial Anti-Adhesion Activity of Cranberry Products, *Journal of Dietary Supplements*, DOI: 10.1080/19390211.2023.2276962.

Signé pour PHARMATOKA

Marie-Pierre Lafon
R&D / Technico-réglementaire

13 Décembre 2023

