

**Odpowiedź Zarządu Cambridge Chocolate Technologies S.A. na pismo przedstawione
przez Akcjonariusza w trybie art. 428 § 6 Kodeksu spółek handlowych
oraz informacja nt. odpowiedzi udzielonych Akcjonariuszowi ustnie
na Zwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Spółki w dniu 26 czerwca 2019 roku**

W dniu 26 czerwca 2019 roku, w trakcie obrad Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia spółki Cambridge Chocolate Technologies S.A. (dalej jako „**Zgromadzenie**”), (Cambridge Chocolate Technologies S.A. dalej jako „**Spółka**” lub „**Emitent**”), przedstawiciele Towarzystwa Funduszy Inwestycyjnych Capital Partners S.A. („**TFI CP**”) – wnioskodawcy, objętego porządkiem obrad Zgromadzenia, wniosku w sprawie „wyboru rewidenta do spraw szczególnych w celu zbadania, na koszt Spółki określonych zagadnień związanych z prowadzeniem spraw Spółki” (dalej jako „**Wniosek**”), na prośbę Zarządu Spółki o zadanie pytań, które pozwoliłyby wyjaśnić wątpliwości TFI CP w zakresie funkcjonowania Spółki wskazane we Wniosku, zadali następujące trzy pytania:

- 1) *Które technologie na bazie których powstają produkty komercjalizowane przez Spółkę mają zabezpieczoną własność intelektualną?*
- 2) *Jaki jest stopień zaawansowania postępowań w sprawie zgłoszonych patentów oraz przewidywanej daty uzyskania rejestracji patentów w odniesieniu do określonych technologii?*
- 3) *Jakie podmioty dokonały zgłoszeń patentowych technologii na bazie których powstają produkty komercjalizowane przez Spółkę? Na jakich zasadach Spółka korzysta z praw patentowych?*

Na Zgromadzeniu obecni byli wszyscy Członkowie Zarządu Spółki przygotowani do odpowiedzi na wszelkie pytania merytoryczne oraz na wyjaśnienia wszelkich wątpliwości i nieścisłości, które TFI CP wskazywał we Wniosku, przy czym formalna i merytoryczna ocena Wniosku została uprzednio wyrażona w opinii Zarządu Spółki opublikowanej raportem bieżącym ESPI nr 5/2019 oraz raportem bieżącym EBI nr 12/2019.

Na powyższe, jedyne pytania merytoryczne zadane podczas Zgromadzenia, Zarząd udzielił odpowiedzi ustnej podczas obrad Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia oraz zobowiązał się do udzielenia dodatkowych, szczegółowych danych poza Zgromadzeniem.

Dodatkowo, przedstawiciele TFI CP w trakcie Zgromadzenia zapowiedzieli, że w trakcie przerwy Zgromadzenia (ogłoszona do dnia 23 lipca 2019 r. do godziny 13.00), zadadzą dodatkowe pytania.

W przerwie Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia, w dniu 9 lipca 2019 r. wpłynął wniosek **TFI CP** o udzielenie informacji w trybie art. 428 § 6 Kodeksu spółek handlowych. Cytując przedmiotowy wniosek, TFI CP zażądało udostępnienia „*wszelkich informacji dotyczących Spółki, które okażą się niezbędne do wyjaśnienia wszystkim współwłaścicielom Spółki wątpliwości przedstawionych w sposób skonkretyzowany poprzez odpowiednie sformułowanie przedmiotu i zakresu wnioskowanego przez Akcjonariusza badania dokonywanego wysiłkiem rewidenta do spraw szczególnych, zgodnie z projektami uchwał rozpatrywanymi w ramach pkt. 6 oraz 7 porządku obrad walnego Zgromadzenia (...), nie później niż do dnia poprzedzającego wznowienie obrad Walnego Zgromadzenia (czyli do dnia 22 lipca 2019 r.)*”.

W związku z ww. wnioskiem, Zarząd Spółki niniejszym, w załączeniu do niniejszego pisma, przedstawia pisemnie odpowiedzi na ww. trzy pytania, które zostały zadane w trakcie Zgromadzenia i na które Zarząd Spółki odpowiedział ustnie podczas Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia oraz na wszystkie dodatkowe pytania, które zostały przedstawione w treści projektów uchwał do punktów 6

oraz 7 porządku obrad przyjętego Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia dotyczących wyboru, na koszt Spółki, rewidenta do spraw szczególnych, które zostały opublikowane raportem bieżącym ESPI nr 3/2019 oraz raportem bieżącym EBI 10/2019.

Z poważaniem

Zarząd Cambridge Chocolate Technologies S.A.

Załącznik 1: Odpowiedź Zarządu Cambridge Chocolate Technologies S.A. na przedstawione na Zwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Akcjonariuszy pytania przez przedstawicieli Towarzystwa Funduszy Inwestycyjnych Capital Partners S.A. z siedzibą w Warszawie z dnia 26 czerwca 2019 roku.

Załącznik 2: Odpowiedzi Zarządu Cambridge Chocolate Technologies S.A. na przedstawione pytania w treści projektu uchwały do punktu 7 porządku obrad Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia w sprawie wyboru, na koszt Spółki, rewidenta do spraw szczególnych.

Załącznik 2a: Dokumentacja „white-papers” dla poszczególnych technologii opracowywanych przez Spółkę.

Załącznik 3: Odpowiedzi Zarządu Cambridge Chocolate Technologies S.A. na przedstawione pytania w treści uchwały do punktu 6 porządku obrad Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia w sprawie wyboru, na koszt Spółki, rewidenta do spraw szczególnych.

ZAŁĄCZNIK 1

Odpowiedź Zarządu Cambridge Chocolate Technologies S.A. na przedstawione na Zwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Akcjonariuszy pytania przez przedstawicieli Towarzystwa Funduszy Inwestycyjnych Capital Partners S.A. z siedzibą w Warszawie z dnia 26 czerwca 2019 roku.

Pytanie 1: „Które technologie, na bazie których powstają produkty komercjalizowane przez Spółkę mają zabezpieczoną własność intelektualną?”

Odpowiedź: Wg najlepszej wiedzy Zarządu wszystkie technologie, na bazie których powstają produkty komercjalizowane przez Spółkę, mają zabezpieczoną własność intelektualną. Szczegółowy zakres ochrony wskazany został w odpowiedzi na pytanie nr 2. Zgodnie z informacją zawartą w Dokumencie Informacyjnym w marcu 2017 r. oraz z Opinią Zarządu opublikowaną w dniu 25.06.2019 r. Emitent nabył od Spółek IP Science oraz IMM D Sp. z o.o. wyłączne, nieodwołalne i nieograniczone czasowo i terytorialnie prawo do komercjalizacji i sprzedaży produktów w obszarze słodczy funkcjonalnych, żywności i suplementów diety. Produkty rozwijane i komercjalizowane przez Spółkę oparte są na potwierdzonych klinicznie technologiach opracowanych w Cambridge w Wielkiej Brytanii. Wynalazcą technologii jest dr Ivan Petyaev. Spółka licencjonuje od wynalazcy dwie technologie (Astacelle, ChocBerry) oparte na pięciu zgłoszeniach patentowych. Poniższa tabela opisuje poszczególne zgłoszenia wraz z powiązaniem zgłoszeń patentowych z rozwijanymi produktami.

	OPIS ZGŁOSZENIA	DATA PIERWSZEŃSTWA	TECHNOLOGIA	PRODUKT
Functional Chocolate	Wynalazek odnosi się do żywności funkcjonalnej składającej się z produktów, w których wykorzystano ziarno kakaowe oraz ekstrakt roślinny bogaty w polifenole. Takie połączenie skutkuje nieoczekiwanymi korzyściami zdrowotnymi a jednocześnie redukuje lub zapobiega po posiłkowym skokom poziomu glukozy we krwi. Odkrycie ma zastosowanie m.in. w mlecznej czekoladzie, nadając jej właściwości zbliżone do ciemnej (gorzkiej) czekolady lub do kremu czekoladowego, czy czekolady ciemnej wzmagając jej właściwości prozdrowotne. Właściwości te to m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwdziałające hipoksji (niedotlenieniu) tkanek, czy wspierające układ krążenia.	2016-11-10	ChocBerry	Rechoc, Elate
Lycosome Micelle Technology – carotenoids particles and use thereof	Odkrycie odnosi się do sposobu dostarczenia cząsteczek do krwiobiegu po podaniu doustnym. Zastosowanie technologii Lycosome (będącej połączeniem karotenoidu oraz ewentualnie cząsteczki cargo) chroni te substancje przed degradacją w układzie trawienia oraz poprawia wchłanianie w formie niezmodyfikowanej a przez to podnosi ich biodostępność we krwi. Umożliwia to zmniejszenie dawki koniecznej do osiągnięcia danego efektu lub podniesienie skuteczności dotychczasowej dawki substancji.	2011-01-31	Astacelle	Esthechoc Mitochoc

Acid Inflammatory Oxidation & its control – product and method (tytuł oryginalny: Products and methods)	Wynalazek dotyczy odżywczych, kosmetycznych, profilaktycznych i terapeutycznych zastosowań grzybów spożywczych, produktów fermentacyjnych i ich ekstraktów. Wynalazek odnosi się w szczególności do obniżenia podwyższonego poziomu cholesterolu i/lub trójglicerydów, jak również do leczenia lub zapobiegania infekcji, zapalenia, uszkodzeń zapalnych, miażdżycy, chorób serca, chorób żołądka, stanów zapalnych jelit i wątroby oraz ich powikłań, a także do promowania lub stymulowania regeneracji lub leczenia ran, oparzeń, owrzodzeń lub innych form uszkodzonych lub starzejących się tkanek. Wynalazek zastrzega dodatkowo test do oceny stanu zapalnego uszkodzeń oksydacyjnych (IOD) obejmującego: a) otrzymanie próbki tkanki ludzkiej, homogenatu próbki tkanki, surowicy lub osocza; b) dodanie źródła jonów wodorowych zdolnych do działania jako substrat dla dysmutazy nadtlenkowej; c) inkubacja próbki przez 6-24 godziny; oraz d) wykonanie testu MDA w celu określenia poziomu utlenienia.	2011-09-06	Astacelle, Chocberry	Esthechoc Rechoc MitoChoc Elate
Resveratrol Antibodies & Assay (Oryginalny tytuł: Antibody specific for trans - resveratrol and use thereof)	Metoda wykorzystanie specyficznych dla trans – resweratrolu przeciwciał do oceny jego stężenia w próbce. Patent opisuje także wytworzenie przeciwciał przeciw trans – resweratrolowi.	2011-11-11	Astacelle, Chocberry	Rechoc
Anti-lipoprotein antibodies & complex – method and assessing risk of atherosclerosis (tytuł oryginalny: Diagnosis and treatment of atherosclerosis)	Wynalazek dotyczy identyfikacji przeciwciał utleniających lipidy jako kluczowego czynnika chorobotwórczego w chorobach miażdżycowych. Obecność takich przeciwciał jest ważnym wyznacznikiem diagnostyki i prognozowania takich zaburzeń, a także przedstawia metody i środki oceny stanu miażdżycy. Metody opisane w wynalazku są przydatne w diagnostyce klinicznej, prognozowaniu, profilaktyce i terapii miażdżycy oraz zaburzeń pokrewnych, a także w uzyskaniu pomiaru poziomu utlenienia lipoprotein.	2001-08-22	Astacelle, Chocberry	Esthechoc Rechoc MitoChoc Elate

Pytanie 2: „Jaki jest stopień zaawansowania postępowań w sprawie zgłoszonych patentów oraz przewidywanej daty uzyskania rejestracji patentów w odniesieniu do określonych technologii?”

Odpowiedź: Poniższa tabela prezentuje stopień zaawansowania postępowań w sprawie zgłoszonych patentów. Należy podkreślić, że wszelkie dane dotyczące zgłoszeń patentowych oraz ich treści mają charakter publiczny i dostępne są w domenie publicznej w międzynarodowych bazach patentowych, w szczególności na oficjalnej stronie: <https://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf>

IMMD Sp. Z.o.o.	Serial Number	Filing date	Country	Status
Functional Chocolate				
	CN109922664	08.05.2019	China	Application
	BR112019009360	08.05.2019	Brasil	Application
	CA3043398	09.05.2019	Canada	Application
	EP17829923	03.06.2019	EPO	Application
	GB1619044.9	11.11.2016	GB	Abandoned (will go back to GB after the International phase)
	IL266265	28.04.2019	Israel	Application
	JP	08.05.2019	Japan	Application
	PL419423	10.11.2016	Poland	Under examination
	US 16/348641	09.05.2019	USA	Application
	WO2018087305	10.11.2017	WIPO	International Application (ISR received)
IP Science Ltd.	Serial Number	Filing date	Country	Status
CAROTENOID PARTICLES AND USES THEREOF				
	US201715649401	13.07.2017	USA	Application
	2016 11394		Ukraine	Application
	2018-008988		Japan	Application (Decision to Grant the patent received)
	7274/DELNP/2013	16.08.2013	India	Application
	AU2012213235	19.08.2013	Australia	Granted
	CA2825860	26.07.2013	Canada	Application
	CN103370053	25.05.2012	China	Granted with 42 claims
	CN107028936		China	Application
	EA201300875	25.01.2012	Eurasia	Application
	EP2670392		EPO	Application
	GB1101669	31.01.2011	GB	Terminated before Grant
	HK1190629	23.04.2014	HongKong	Granted
	JP2013550941	30.07.2013	Japan	Granted with 14 claims.
	UA115121	27.08.2013	Ukraine	Granted with 42 claims
	US9737602	08.01.2016	USA	Granted with 20 claims
	WO2012104576	31.01.2012	WIPO	International Application
DIAGNOSIS OF ATHEROSCLEROSIS				
	EP1366369	09.10.2003	EPO	Abandoned
	GB0321080.4	15.02.2002	GB	Granted
	US7713747			Granted
PRODUCTS AND METHODS				
	CA2846295	06.09.2012	Canada	Application
	US2014370047	02.04.2014	USA	Issued patent
	2018-154638	17.05.2018	Japan	Application
	AU2012306078	18.02.2014	Australia	Granted with 24 claims
	CN201280043466		China	Application abandoned (one year to renew the application)
	EA201400319	06.09.2012	Eurasia	Application
	EP2753193	28.03.2014	EPO	Granted (Validated in: AT, BE, BG, CH, CZ, DE, DK, EE, ES, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LI, LU, MC, MK, MT, PL, RO, RS, SI, SK, SM, TR)
	GB1115417	06.09.2011	GB	Terminated before grant
	HK1196041	23.09.2014	HongKong	undergoing registration and grant
	JP2018095055	17.05.2018	Japan	Application
	JP2014527744	04.03.2014	Japan	Granted with 9 claims
	UA114605	04.03.2014	Ukraine	Granted with 15 claims
	UA201703223		Ukraine	Application
	US2018311292	05.07.2018	USA	Continuation Application
	WO2013034911	06.09.2012	WIPO	International Application
ANTIBODY SPECIFIC FOR TRANS - RESVERATROL AND USE THEREOF				
	US201615370902	25.05.2017	USA	Application
	US9547001	09.11.2012	USA	Granted
	AU2012335353	05.05.2014	Australia	Granted with 12 claims
	CA2856200	07.05.2014	Canada	Under examination
	CN104093737	08.10.2014	China	Granted
	EA201400571	10.06.2014	Eurasia	Application
	EP2776464	09.06.2014	EPO	Granted (Validated in CH, DE, FR, GB, IE, LI)
	GB1119585		GB	Terminated before grant
	HK1197248	27.10.2014	Hong Kong	Granted
	WO2013068758	09.11.2012	WIPO	International Application

Pytanie 3: *Jakie podmioty dokonały zgłoszeń patentowych technologii, na bazie których powstają produkty komercjalizowane przez Spółkę? Na jakich zasadach Spółka korzysta z praw patentowych?”*

Odpowiedź: Zgłoszeń dokonały spółki IP Science oraz IMMD Sp. z o.o., które udzieliły Emitentowi wyłącznego, nieodwołalnego, nieograniczonego czasowo i terytorialnie prawa do komercjalizacji oraz sprzedaży produktów w obszarze słodczy funkcjonalnych, żywności i suplementów diety. Poniższa tabela prezentuje podmioty, które dokonały poszczególnych zgłoszeń patentowych a następnie udzieliły wyłącznej, nieograniczonej licencji Spółce:

	PODMIOT ZGŁASZAJĄCY	DATA PIERWSZEŃSTWA	TECHNOLOGIA
Functional Chocolate	IMMD Sp z o.o.	2016-11-10	ChocBerry
Lycosome Micelle Technology – carotenoids particles and use thereof	IP Science Ltd.	2011-01-31	Astacelle
Acid Inflammatory Oxidation & its control – product and method (tytuł oryginalny: Products and methods)	IP Science Ltd.	2011-09-06	Astacelle, Chocberry
Resveratrol Antibodies & Assay (Oryginalny tytuł: Antibody specific for trans - resveratrol and use thereof)	IP Science Ltd.	2011-11-11	Astacelle, Chocberry
Anti-lipoprotein antibodies & complex – method and assessing risk of atherosclerosis (tytuł oryginalny: Diagnosis and treatment of atherosclerosis)	IP Science Ltd.	2001-08-22	Astacelle, Chocberry

ZAŁĄCZNIK 2

Odpowiedź Zarządu Cambridge Chocolate Technologies S.A. na pytania wskazane przez Towarzystwo Funduszy Inwestycyjnych Capital Partners S.A. z siedzibą w Warszawie w treści projektu uchwały do punktu 7 porządku obrad Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia w sprawie wyboru, na koszt Spółki, rewidenta do spraw szczególnych

Pytanie a: na czym polegają prace badawczo-rozwojowe prowadzone przez Spółkę od chwili jej powstania do dnia przeprowadzenia badania;

Odpowiedź: Prace badawczo-rozwojowe prowadzone przez Spółkę od chwili jej powstania obejmują: opracowanie formułacji poprzez odpowiedni dobór składników oraz ich proporcji, przeprowadzenie testów laboratoryjnych w celu weryfikacji właściwości użytkowych oraz biochemicznych opracowanej formułacji, przeprowadzenie testów produkcyjnych w skali laboratoryjnej, półprzemysłowej oraz przemysłowej (skalowanie produkcji), optymalizację procesów technologicznych, co umożliwi wielkoskalową produkcję zachowując optymalny poziom kosztów wytworzenia (optymalizacja kosztów produkcji), weryfikację kliniczną wersji prototypowych oraz finalnych produktów.

Prace badawczo-rozwojowe prowadzone przez Spółkę od chwili jej powstania obejmują rozwój produktów na bazie dwóch technologii:

- Technologia Astacelle dotyczy formułacji karotenoidowo-fosfolipidowych kompleksów- miceli, które zapewniają optymalną biodostępność karotenoidów, jak i udokumentowaną przewagę konkurencyjną w zakresie aktywności biologicznej tych związków.
- Technologia ChocBerry dotyczy metody produkcji oraz wbudowywania w format żywności substancji czynnych, które pozwalają na osiągnięcie równoważnego z czekoladowym (czekolada gorzka) profilu polifenoli we krwi oraz ich ekwiwalentnej aktywności w zakresie działania antyoksydacyjnego i wspierającego układ sercowo-naczyniowy (efekt biodostępności polifenoli).

Prace badawczo-rozwojowe prowadzone przez Spółkę od chwili jej powstania zaowocowały opracowaniem portfolio zgodnie z poniższą tabelą:

PRODUKT	RODZAJ CZEKOLADY	KATEGORIA PRAWNA	ZASTOSOWANIE	STATUS
Esthechoc	Ciemna	Suplement Diety	Pielęgnacja skóry	w sprzedaży
Rechoc	Ciemna	Żywność	Dieta sirtuinowa	W sprzedaży pilot
Linia Elate	Mleczna / Ciemna / Biała / Spread	Żywność	Rynek masowy, zdrowa żywność	W procesie wdrożenia rynkowego

W minionym okresie prowadzone były także prace badawczo-rozwojowe dla produktu Mito-choc (baton energetyczny), którego formułacja została opracowana w skali laboratoryjnej. Na dzień niniejszego pisma Spółka wstrzymała działania w zakresie wdrożenia produktu, skupiając się na działaniach zmierzających do komercjalizacji produktów Esthechoc, Rechoc oraz linii Elate.

Pytanie b: czy Spółka dysponuje wynikami badań określanych jako kliniczne potwierdzającymi określone właściwości produktów, a jeśli tak to jakie to są badania kliniczne (autorzy, tytuły i miejsca publikacji) i których Produktów dotyczą;

Odpowiedź: Spółka dysponuje wynikami badań klinicznych, potwierdzającymi określone właściwości produktów. Właściwości obu rozwijanych technologii zostały potwierdzone w badaniach klinicznych z pomiarem parametrów biochemicznych i metabolicznych w skórze oraz w surowicy. W załączeniu do niniejszego pisma Spółka ponownie przedstawia dokumentację dla poszczególnych produktów, opisującą rynek, właściwości produktów oraz otrzymane wyniki badań. (załącznik 1)

Na bazie otrzymanych wyników przeprowadzonych badań klinicznych opublikowano następujące artykuły w renomowanych międzynarodowych czasopismach naukowych (również w formie dostępnej w Internecie), a kolejne publikacje są w przygotowaniu:

- Markers of Hypoxia and Oxidative stress in aging volunteers ingesting lycosomal formulation of dark chocolate containing astaxanthin (<https://link.springer.com/article/10.1007/s12603-018-1063-z>)
- Astaxanthin Co-Crystallized With Dark Chocolate Causes a Dose-dependent Inhibition of Oxidation Markers in Middle-aged Volunteers (<http://www.sciencedirect.com/AJFN/abstract/9896>)
- Lycosome Formulation of Dark Chocolate Increases Absorption Cocoa Catechins and Augments Their Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties (<http://www.aascit.org/journal/archive2?journalId=907&paperId=4277>)
- Reduction in blood pressure and serum lipids by lycosome formulation of dark chocolate and lycopene in prehypertension. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.169>)

Pytanie c: czy badania określane mianem „kliniczne”, mające potwierdzać określone właściwości Produktów komercjalizowanych przez Spółkę spełniają standardy i kryteria badań klinicznych zgodnie z powszechnie obowiązującymi przepisami prawa oraz rekomendacjami/wytycznymi wydawanymi przez uprawnione organy międzynarodowe

Odpowiedź: Badania mające potwierdzać określone właściwości Produktów komercjalizowanych przez Spółkę spełniają standardy i kryteria badań klinicznych, zgodnie z powszechnie obowiązującymi przepisami prawa oraz rekomendacjami/wytycznymi wydawanymi przez uprawnione organy międzynarodowe.

Spółka rozwija produkty o statusie rejestracyjnym suplementów diety (Esthechoc) oraz żywności ogólnego przeznaczenia (pozostałe produkty w portfolio). Określenie badań klinicznych odnosi się zarówno do badań produktów leczniczych, co wynika wprost z ustawy Prawo farmaceutyczne i produktów o innym statusie rejestracyjnym – w tym żywności, suplementów diety, metod diagnostycznych i innych. Badania z wykorzystaniem suplementów diety rejestrowane są także w bazach danych, do których zgłaszane są badania z wykorzystaniem substancji farmakologicznych. Przykładem takiej bazy może być clinicaltrials.gov, w której pod hasłem „food supplement” znaleźć można 11519 wpisów.

Wszystkie badania kliniczne dotyczące technologii rozwijanych przez Spółkę zostały wykonane z pomiarem parametrów biochemicznych i metabolicznych w skórze i przeprowadzone zostały:

- a. w ośrodkach klinicznych z zaangażowaniem kadry medycznej,

- b. na podstawie zatwierdzonych protokołów badawczych przez autoryzowane lokalne komisje bioetyczne,
- c. z zachowaniem standardu badań klinicznych w kontekście liczebności prób, zastosowanych statystyk, zaślepienia, randomizacji i innych.

Prowadzone badania są rejestrowane oraz zatwierdzane przez niezależny autoryzowany podmiot rejestrujący badania kliniczne, a informacja o badaniach znajduje się w domenie publicznej: <https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?id=364779>

Zgodnie z punktem powyżej (b) należy także podkreślić, że na bazie otrzymanych wyników przeprowadzonych badań klinicznych opublikowano artykuły w renomowanych międzynarodowych czasopismach naukowych. Metodologia przeprowadzonych badań, zastosowane metody badawcze oraz wszelkie niezbędne zgody komisji bioetycznych są w pierwszym kroku rygorystycznie oceniane przez komisję dopuszczającą dany artykuł do publikacji. Dopiero po analizie formalnej dochodzi do analizy merytorycznej, oceniającej jakość otrzymanych wyników.

Pytanie d: *jaki status posiadają poszczególne Produkty (suplement diety, środek spożywczy, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego itp.);*

Odpowiedź: Spółka rozwija produkty o statusie rejestracyjnym suplementów diety (Esthechoc) oraz żywności ogólnego przeznaczenia (pozostałe produkty w portfolio).

Pytanie e: *czy Technologie, zastosowane do wytwarzania Produktów mają potwierdzone w badaniach klinicznych działanie (walidację) lub skuteczność – na co wskazuje pkt. 5.6., 5.15.1. oraz 5.15.2. Memorandum i z czego to ma wynikać;*

Odpowiedź: Spółka posiada wyniki wszystkich badań prowadzonych na produktach wchodzących w portfolio Spółki, potwierdzających ich działanie oraz skuteczność. Wszystkie badania kliniczne dotyczące technologii rozwijanych przez Spółkę zostały wykonane z pomiarem parametrów biochemicznych i metabolicznych we krwi oraz w skórze. Szczegółowa informacja została przedstawiona w punkcie b i c niniejszego pisma.

Pytanie f: *czy Spółka dysponuje wynikami marketingowych badań klinicznych Produktów, a jeśli tak, to których Produktów one dotyczą i na czym dokładnie polegają marketingowe badania kliniczne, o których mowa w pkt 5.15.1. Memorandum i Jaka jest ich podstawa prawna;*

Odpowiedź: Marketingowe badania kliniczne mają na celu potwierdzenie walorów użytkowych produktów w badaniach klinicznych, wykorzystywanych w celach marketingowych. Prowadzone są one po wprowadzeniu produktów na rynek w celu wzmocnienia danego przekazu marketingowego. W celu przeprowadzenia dodatkowych, marketingowych badań klinicznych Spółka zawiązała współpracę z kontraktową organizacją badawczą (ang. clinical reserch organisation, CRO), która opracowała harmonogramy, budżety oraz protokoły planowanych badań wraz ze wskazaniem ośrodków badawczych. Dla produktu Esthechoc ostatecznie Spółka nie zdecydowała się na ich przeprowadzenie. Dla linii produktów Elate badania są planowane do przeprowadzenia.

Pytanie g: *kto jest wynalazcą Technologii, czy Technologie są objęte patentem lub w inny sposób zabezpieczone zostały prawa Spółki do Technologii oraz czy Technologie, bądź technologie tożsame, były dotychczas wykorzystywane w produkcji wyrobów konkurencyjnych;*

Odpowiedź: Produkty rozwijane i komercjalizowane przez Spółkę oparte są na potwierdzonych klinicznie technologiach opracowanych w Cambridge w Wielkiej Brytanii. Wynalazcą technologii jest dr Ivan Petyaev. Wszystkie technologie objęte są zgłoszeniami patentowymi. Zgłoszenia patentowe obejmują technologie, jak również metody diagnostyczne i pomiarowe wykorzystane w badaniach:

- Functional Chocolate
- Lycosome Micelle Technology – carotenoids particles and use thereof
- Acid Inflammatory Oxidation & its control – product and method (tytuł oryginalny: Products and methods)
- Resveratrol Antibodies & Assay (Oryginalny tytuł: Antibody specific for trans - resveratrol and use thereof)
- Anti-lipoprotein antibodies & complex – method and assessing risk of atherosclerosis (tytuł oryginalny: Diagnosis and treatment of atherosclerosis)

Technologie wykorzystywane przez Spółkę nie zostały wykorzystane w produkcji wyrobów konkurencyjnych, które określa umowa licencyjna pomiędzy firmą Lycotec Ltd. i CCT S.A.

Pytanie h: czy informacje zawarte w materiałach marketingowych, reklamowych, promocyjnych wykreowane w ramach globalnej polityki marketingowej prowadzonej przez Spółkę, bądź podmioty z nią powiązane, są zgodne z aktualnie dostępnymi, zatwierdzonymi informacjami na temat właściwości substancji zawartych w Produktach komercjalizowanych przez Spółkę oraz z publikacjami naukowymi;

Odpowiedź: Wszystkie informacje zawarte w materiałach dowolnego typu, które zostały udostępnione przez Spółkę (i/lub podmioty powiązane) są zgodne z wiedzą na temat tych substancji. Zostały one pozyskane przede wszystkim z publikacji naukowych, a część wyników została opublikowana w recenzowanych i powszechnie uznanych czasopismach naukowych.

Pytanie i: czy technologia Astacelle, na bazie której oparty jest pierwszy z komercjalizowanych przez Spółkę produktów – Esthechoc, polegająca na formulacji karotenoidowo-fosfolipidowych odwróconych miceli, zapewnia dzięki nim istotnie wyższą biodostępność karotenoidów, jak i udokumentowaną przewagę konkurencyjną w zakresie aktywności biologicznej tych związków oraz czy zastosowanie tej technologii chroni transportowane substancje aktywne przed degradacją w przewodzie pokarmowym na skutek działania kwasu solnego – na co wskazuje pkt 5.15.2. Memorandum;

Odpowiedź: Przeprowadzone badania potwierdzają tą tezę. Wyniki oraz założenia technologii opisane zostały w zgłoszeniu patentowym „Lycosome Micelle Technology – carotenoids particles and use thereof”. Opis zgłoszenia: „Odkrycie odnosi się do sposobu dostarczenia cząsteczek do krwiobiegu po podaniu doustnym. Zastosowanie technologii Lycosome (będącej połączeniem karotenoidu oraz ewentualnie cząsteczki cargo) chroni tę substancję przed degradacją w układzie trawienia oraz poprawia wchłanianie w formie niezmodyfikowanej, a przez to podnosi ich biodostępność we krwi. Umożliwia to zmniejszenie dawki koniecznej do osiągnięcia danego efektu lub podniesienie skuteczności dotychczasowej dawki substancji”. Wyniki oraz założenia technologii zostały opisane również w publikacjach wymienionych w punkcie b niniejszego pisma.

Pytanie j: czy technologia ChocBerry, na bazie, której oparte są pozostałe produkty komercjalizowane przez Spółkę – PeakEpic oraz Rechoc – polegająca na metodzie produkcji oraz wbudowywania w format żywności substancji czynnych, pozwala dzięki temu na osiągnięcie równoważnego z czekoladowym

profilu polifenoli we krwi oraz ich ekwiwalentnej aktywności w zakresie działania antyoksydacyjnego i wspierającego układ sercowo-naczyniowy – na co wskazuje pkt 5.15.2. Memorandum;

Odpowiedź: Przeprowadzone badania potwierdzają tą tezę. Wyniki oraz założenia technologii opisane zostały w zgłoszeniu patentowym pt.: „Functional Chocolate”. Opis patentu: „Wynalazek odnosi się do żywności funkcjonalnej składającej się z produktów, w których wykorzystano ziarno kakaowe oraz ekstrakt roślinny bogaty w polifenole. Takie połączenie skutkuje nieoczekiwanymi korzyściami zdrowotnymi, a jednocześnie redukuje lub zapobiega poposiłkowym skokom poziomu glukozy we krwi. Odkrycie ma zastosowanie m.in. w mlecznej czekoladzie, nadając jej właściwości zbliżone do ciemnej (gorzkiej) czekolady lub do kremu czekoladowego czy czekolady ciemnej, wzmagając jej właściwości prozdrowotne. Właściwości te to m.in. działanie antyoksydacyjne, wspierające poprawę parametrów hipoksji (niedotlenienia tkanek) czy wspierające układ krążenia”.

***Pytanie k:** czy produkty oparte na technologii ChocBerry charakteryzują się dużo wyższą biodostępnością i aktywnością związków polifenolowych oraz niższym poziomem glukozy we krwi po ich spożyciu –na co wskazuje pkt 5.15.2. Memorandum;*

Odpowiedź: Podobnie jak w punkcie poprzednim teza ta jest oparta na wynikach przeprowadzonych badań.

***Pytanie l:** czy technologia Astacelle gwarantuje wysoką biodostępność i przyswajalność składników odżywczych znajdujących się w produkcie – karotenoidu astaksantyny i epikatechin – na co wskazuje pkt 5.16.1. Memorandum;*

Odpowiedź: Tezę tę potwierdzają badania randomizowane, zaślepione, przeprowadzone w reżimie badań klinicznych. Badania te zostały opisane w artykułach opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych:

- Markers of Hypoxia and Oxidative stress in aging volunteers ingesting lycosomal formulation of dark chocolate containing astaxanthin (<https://link.springer.com/article/10.1007/s12603-018-1063-z>)
- Astaxanthin Co-Crystallized With Dark Chocolate Causes a Dose-dependent Inhibition of Oxidation Markers in Middle-aged Volunteers (<http://www.sciencedirect.com/journal/food-bioavailability/abstract/S0950268818300096>)
- Lycosome Formulation of Dark Chocolate Increases Absorption Cocoa Catechins and Augments Their Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties (<http://www.aascit.org/journal/archive2?journalId=907&paperId=4277>)
- Reduction in blood pressure and serum lipids by lycosome formulation of dark chocolate and lycopene in prehypertension. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.169>)

Badania zostały zarejestrowane w ogólnodostępnym rejestrze badań klinicznych:

Effect of lycopene-containing lycosome-formulated dark chocolate on lipid profile and parameters of cardiovascular health in pre-hypertensive and hyperlipidemic individuals (<https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?id=364779>)

Bioavailability of dietary antioxidants in volunteers (<http://www.isrctn.com/ISRCTN89815519?q=&filters=conditionCategory:Nutritional%5C,%20Metabolic%5C,%20Endocrine,ageRange:Adult,recruitmentCountry:United%20Kingdom&sort=&offset=165&totalResults=543&page=2&pageSize=100&searchType=basic-search>)

Bioavailability of dietary antioxidants in volunteers (<http://www.isrctn.com/ISRCTN89815519?q=&filters=conditionCategory:Nutritional%5C,%20Metabolic%5C,%20Endocrine,ageRange:Adult,recruitmentCountry:United%20Kingdom&sort=&offset=165&totalResults=543&page=2&pageSize=100&searchType=basic-search>).

Wyniki dostępne są także we wspomnianym wcześniej zgłoszeniu patentowym: Lycosome Micelle Technology – carotenoids particles and use thereof.

Pytanie m: czy właściwości Technologii zostały potwierdzone w randomizowanych zaślepionych badaniach klinicznych z pomiarem parametrów biochemicznych i metabolicznych w skórze oraz w surowicy –na co wskazuje pkt 5.15.2.Memorandum;

Odpowiedź: Wyniki te zostały opisane w źródłach przytoczonych w punkcie poprzednim.

Pytanie n: czy wyniki badań określanych mianem kliniczne produktów wytworzonych według technologii Astacelle, na bazie której oparty jest pierwszy z komercjalizowanych przez Spółkę produktów –Esthehoc, potwierdzają wyższą skuteczność produktu w porównaniu z innymi suplementami diety zawierającymi astaksantynę;

Odpowiedź: Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem preparatów zawierających astaksantynę w postaci kapsułek (preparaty o dwóch różnych zawartościach astaksantyny: 5 i 10 mg), jak również z wykorzystaniem gorzkiej czekolady i kapsułek podawanych jako dwa osobne preparaty, lecz jednocześnie (kapsułka z 5 mg astaksantyny). Otrzymane wyniki potwierdzają tezę o wyższej skuteczności Esthehoc w porównaniu z innymi preparatami zawierającymi astaksantynę. Wyniki badań opisane są w źródłach opisanych powyżej.

Pytanie o: czy przedstawiony w pkt 5.16.1. Memorandum wykres prezentujący wyniki badań poziomu saturacji tlenu w skórze przed oraz po 4 tygodniach spożywania produktu Esthehoc, astaksantyny, gorzkiej czekolady oraz astaksantyny (w kapsułkach) łącznie z gorzką czekoladą odzwierciedla rzeczywiste wyniki nasycenia tkanek tlenem uzyskane w badaniu oraz czy został on oparty na podstawie wyników badań przeprowadzonych zgodnie z zasadami i kryteriami określonymi dla tego rodzaju badań w powszechnie obowiązujących przepisach prawa oraz rekomendacjach/wytocznych wydawanych przez uprawnione organy międzynarodowych, w szczególności pozwalających na wyinterpretowanie wniosku o wyższej skuteczności Esthehoc wobec innych form testowanych produktów;

Odpowiedź: Wykres odzwierciedla rzeczywiste wyniki nasycenia tkanek tlenem uzyskane w badaniu. Badanie zostało przeprowadzone z należytą starannością, zgodnie ze sztuką i obowiązującymi zaleceniami. O poprawności stosowanych metod zarówno pomiarowych jak i statystycznych może świadczyć fakt, że zostały one przyjęte do publikacji w recenzowanych czasopismach (per reviewed publication).

Przykładem może być publikacja: „Markers of Hypoxia and Oxidative stress in aging volunteers ingesting lycosomal formulation of dark chocolate containing astaxanthin (<https://link.springer.com/article/10.1007/s12603-018-1063-z>)”

Pytanie p: jak wyglądał proces przygotowania badań Produktów określanych przez Spółkę mianem „klinicznych”, jaki był ich przebieg, jak długo trwały, jaka była liczba uczestników w tych badania.

Odpowiedź: Przebieg badań został opisany w dokumentach typu whitepaper (załącznik) oraz w publikacjach dotyczących poszczególnych produktów (wskazane linki w punkcie b niniejszego pisma).

W skrócie: badanie było zaślepienie, randomizowane z wykorzystaniem preparatów kontrolnych. W trakcie badań nad Esthcochoc przebadano 104 ochotników w wieku 45-70 lat (8-10 w grupie). W przypadku preparatu Rechoc badania prowadzono w 10 grupach po 8 osób.

Badania dotyczące parametrów farmakodynamicznych oraz stężenia astaksantyny we krwi trwały 4 tygodnie dla każdego pacjenta, począwszy od przyjęcia pierwszej dawki. Badania stężenia epikatechin we krwi trwały 3 godziny w przypadku badania Esthechoc. Natomiast badania stężenia resweratrolu w badaniu Rechoc prowadzono w ciągu 4 godzin. Czas trwania tych badań został wybrany na podstawie analizy literatury i wcześniejszych doświadczeń.

ZAŁĄCZNIK 2A

Dokumentacja „white-papers” dla poszczególnych technologii opracowywanych przez Spółkę:

- Esthechoc
- Rechoc
- Polyfount

Astacelle technology

Carotenoids

Carotenoids are pigments responsible for the yellow, orange, and red colours of many fruits and vegetables, although in photosynthetic tissues their colour may be masked by the presence of chlorophylls. Some foodstuffs from animal origin such as eggs, shrimp, lobster, and salmon also contain carotenoids; however, those are derived from dietary sources, as carotenoid biosynthesis occurs only in plants, algae, and some bacteria and fungi. Apart from the carotenoids present in major foodstuffs, the human diet includes carotenoids from spices such as saffron, paprika, and annatto, which have been used since ancient times imparting colour (from carotenoids) and flavour (from carotenoid-derived compounds such as b-ionone and safranal) to many dishes. Due to their intense orange to red colours, carotenoids are also widely used as colorants in the food processing industry.

The structure of carotenoids is based on a C40 isoprenoid backbone that may be acyclic or have one or both ends modified into rings. The hydrocarbon carotenoids are classified as carotenes, and those containing at least one oxygen atom are the xanthophylls (Figure 1). The extended system of conjugated double bonds in the carotenoid backbone is largely responsible for their colour and antioxidant properties [1], [2].

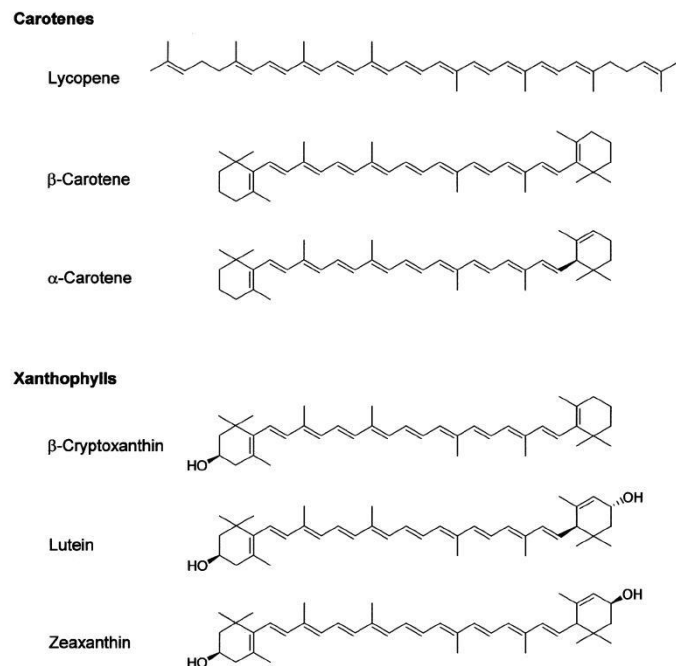


Figure 1. Structures of major carotenoids found in human plasma

The interest in the absorption and function of other carotenoids arose from epidemiological data supporting the protective effects of carotenoid-rich fruits and vegetables against many degenerative diseases, including cardiovascular diseases, age-related macular degeneration, and some types of cancer. The health-promoting effects of carotenoids are related to their antioxidant activity. The antioxidant effects of carotenoids are based on the physical quenching of singlet oxygen [3], [4] and the scavenging of peroxy radicals, particularly at low oxygen tension. In addition, the anticancer effects of carotenoids may be explained by the modulation of various transcription systems, changing the expression of many proteins participating in cell proliferation, growth factor signalling, and gap junctional intercellular communication [4], [5].

The bioavailability of carotenoids is extremely variable, being influenced by many dietary and physiological factors: species of carotenoids, molecular linkage, amount of carotenoids consumed in a meal, matrix in which the carotenoid is incorporated, effectors of absorption and bioconversion, nutrient status of the host, genetic factors, host-related factors, and interactions [6]. The absorption of dietary carotenoids involve several steps starting with the mechanical and enzymatic disruption of the food matrix, release of the carotenoids, followed by their incorporation into lipid droplets of the gastric emulsions. The carotenoids are then transferred from the lipid droplets to mixed micelles produced by the action of bile salts, biliary phospholipids, dietary lipids, and

their hydrolysis products. After the solubilization in mixed micelles, carotenoids are absorbed by the intestinal cells, packed into chylomicrons and secreted to the lymphatic system or portal vein. Each step of the carotenoid absorption may be influenced by multiple factors, thus making difficult the task of assessing the effects of each factor on the overall carotenoid bioavailability [7], [8]. This is also the reason of very variable absorption and bioavailability of carotenoids in case of particular dietary supplements available on the market.

Astaxanthin

Astaxanthin is a xanthophyll carotenoid which is found in various microorganisms and marine animals [9]. The United States Food and Drug Administration (USFDA) has approved the use of astaxanthin as food colorant in animal and fish feed [10]. The European Commission considers natural astaxanthin as a food dye [11]. Astaxanthin is found in a variety of living organisms, many of which are found in the marine environment. It is most prevalent in algae (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) and phytoplankton, but it also can be found in a limited number of fungi and bacteria. *Haematococcus pluvialis* is a green microalga, which accumulates high astaxanthin content under stress conditions such as high salinity, nitrogen deficiency, high temperature and light [12] and is a main source for human consumption [13]. It is used as a source of pigment in the feed for salmon, trout and shrimp [9]. For dietary supplement in humans and animals, astaxanthin is obtained from seafood or extracted from *H. pluvialis* [14]. Astaxanthin has more hydroxyl groups than the other Xanthophylls, which allows it to be more active in the human body than its closely-related family members like lutein and zeaxanthin (Figure 2) [15].

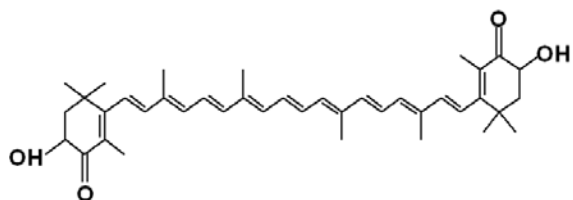


Figure 2. Chemical structure of astaxanthin.

Medicinal uses

The consumption of astaxanthin can prevent or reduce risk of various disorders in humans and animals [13], [14]. The effects of astaxanthin on human health nutrition have been published by various authors [11], [13]–[16]. The use of astaxanthin as a nutritional supplement has been rapidly growing in foods, feeds, nutraceuticals and pharmaceuticals.

Antioxidant Effects

Astaxanthin is one of the most powerful lipophilic antioxidants discovered among carotenoids. As an antioxidant it has been shown to be 550 times stronger than vitamin E, 11 times more potent than beta-carotene and 5 times more potent than lutein [17]–[19]. Astaxanthin, unlike some carotenoids does not convert to vitamin A (retinol) (Figure 3) [18], [19].

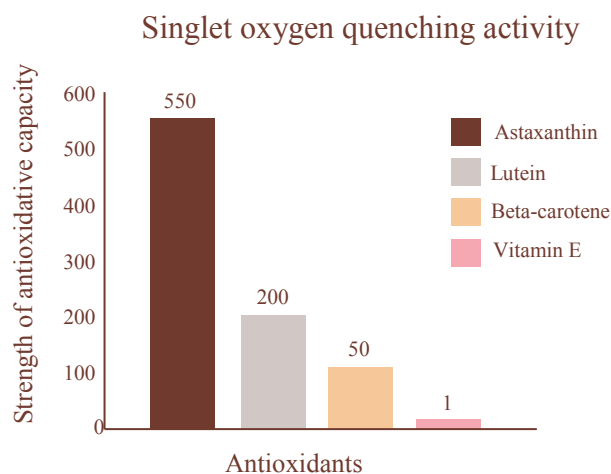


Figure 3. Comparison of the oxidizing properties of carotenoids

Anti Lipid-Peroxidation Activity

Astaxanthin has a unique molecular structure which enables it to stay both in and outside the cell membrane. It gives better protection than β -carotene and Vitamin C which can be positioned inside the lipid bilayer. Astaxanthin and its esters showed 80% anti-lipid peroxidation activity in ethanol induced gastric ulcer rats and skin cancer rats [20] and inhibited lipid peroxidation in biological samples reported by various authors [20]–[22].

Anti-Inflammation

Park et al. [23] reported astaxanthin reduced the DNA oxidative damage biomarker (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)) after 4 weeks of treatment. In addition, subjects fed 2 mg astaxanthin also showed lower plasma C-reactive protein concentrations, demonstrating the anti-inflammatory action of astaxanthin in humans. Haines et al. [24] reported lowered bronchoalveolar lavage fluid inflammatory cell numbers, and enhanced cAMP, cGMP levels in lung tissues after feeding astaxanthin. Moreover, astaxanthin showed protective effect on high glucose induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in proximal tubular epithelial cells. Astaxanthin can prevent skin thickening and reduce collagen reduction against UV induced skin damage [20], [25].

Anti-Diabetic Activity

Astaxanthin could reduce the oxidative stress caused by hyperglycemia in pancreatic β -cells and improve glucose and serum insulin levels [26]. It was also shown to be a good immunological agent in the recovery of lymphocyte dysfunctions associated with diabetic rats [27]. It is also inhibited glycation and glycated protein induced cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells by preventing lipid/protein oxidation [28]. Improved insulin sensitivity in both spontaneously hypertensive corpulent rats and mice on high fat plus high fructose diets was observed after feeding with astaxanthin [29]. Another studies demonstrated that astaxanthin prevents diabetic nephropathy by reduction of the oxidative stress and renal cell damage [30].

Cardiovascular Disease Prevention

Astaxanthin is a very good tonic for the heart. The potential benefits of Astaxanthin have been demonstrated in human clinical trials and/or pre-clinical animal studies.

Astaxanthin is a potential therapeutic agent against atherosclerotic cardiovascular disease [31]. Iwamoto *et al.* [32] reported that consumption of astaxanthin “inhibits LDL oxidation and possibly therefore contributes to the prevention of atherosclerosis”. Astaxanthin effects on blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR), normotensive Wistar Kyoto rats (NWKR) and stroke prone spontaneously hypertensive rats (SPSHR) were reported [33]. Astaxanthin was found in the plasma, heart, liver, platelets, and increased basal arterial blood flow in mice fed with astaxanthin derivative [34]. Human umbilical vein endothelial cells and platelets treated with the astaxanthin

showed increased nitric oxide levels and decrease in peroxynitrite levels [34]. Another researches demonstrated that Astaxanthin may help reduce the consequences of a heart attack. The conclusion was that "Astaxanthin may help with blood fluidity in hypertension, and that it may restore the vascular tone" [35].

Anticancer Activity

Astaxanthin showed significant antitumor activity [36]. It also inhibited the growth of fibrosarcoma, breast, and prostate cancer cells and embryonic fibroblasts [37]. Astaxanthin inhibited cell death, cell proliferation and mammary tumors in chemically induced male/female rats and mice [38]–[40]. Unlike many pharmaceuticals, astaxanthin shows beneficial effects against cancer at each stage of its development. It prevents cancer initiation by protecting DNA from ultraviolet and oxidant damage [41].

Skin UV protection

Astaxanthin functions as a natural sunscreen for marine plants. Because astaxanthin is so effective at absorbing solar radiation, it was proposed it would make an effective topical sunscreen [42]. Astaxanthin may have a number of skin benefits, some more proven than others. In particular, astaxanthin appears to provide some degree of sun protection through multiple mechanisms. First, it blocks a modest amount of ultraviolet light directly (not enough to be an effective sunscreen by itself but still useful). Second, it neutralizes some of the free radicals induced by UV radiation and responsible for some of the sun damage. Third, astaxanthin appears to inhibit the induction of matrix metalloproteinases (MMP) by UV light. (MMP are an important factor in sun damage and skin aging.) [43]

Skin cells that are exposed to ultraviolet light produce bursts of free radicals that trigger aging effects such as skin sagging and wrinkles, and promotes cancer. When astaxanthin is applied to skin cells in culture, it prevents all of those ultraviolet-induced destructive effects, suggesting that it should significantly prevent ultraviolet-induced skin aging [44], [45]. The mechanism of action of astaxanthin is explained by its strong antioxidant capacity and its protective effects against sun irradiation. In vitro studies have demonstrated that astaxanthin improves the function of mitochondria and has good protective effects on human fibroblasts. In that way, it can protect skin cells from free radicals and preserve the collagen layer which result in smooth and youthful

appearance of the skin. The results indicate that astaxanthin has promising anti-wrinkle effects and that it can be helpful in reducing the skin aging process [46].

Polyphenols

Polyphenolic compounds are plant nutraceuticals showing a huge structural diversity, including chlorogenic acids, hydrolyzable tannins, and flavonoids (flavonols, flavanones, flavan-3-ols, anthocyanidins, isoflavones, and flavones). Most of them occur as glycosylated derivatives in plants and foods. In order to become bioactive at human body, these polyphenols must undergo diverse intestinal transformations, due to the action of digestive enzymes, but also by the action of microbiota metabolism. After elimination of sugar tailoring (generating the corresponding aglycons) and diverse hydroxyl moieties, as well as further backbone reorganizations, the final absorbed compounds enter the portal vein circulation towards liver (where other enzymatic transformations take place) and from there to other organs, including behind the digestive tract or via blood towards urine excretion. During this transit along diverse tissues and organs, they are able to carry out strong antiviral, antibacterial, and antiparasitic activities. [47].

Flavonoids are very abundant 15C secondary metabolites in plants, containing two aromatic rings (connected by a heterocycle pyrone ring), which are tailored with diverse hydroxyl moieties. Some are produced at chloroplasts as defense against oxidative damage generated during photosynthesis [48]; others are produced at the sexual organs as defense against solar UV [49], at the root area as attractants for bacterial and fungal symbionts [50], or as defense against virus, bacteria, fungi, and herbivores [47].

All flavonoids derive from L-phenylalanine, due to diverse transformations taking place at the phenylpropanoid pathway. Initial common steps are conversion of L-Phe in cinnamic acid (by phenyl ammonia lyase (PAL)), its conversion in p-coumaric acid (by cinnamate-4-hydroxylase (C4H)), and its transformation in p-coumaroyl-CoA (by 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL)) [51].

In flavonoid biosynthesis, one molecule of p-coumaroyl-CoA and three molecules of malonyl-CoA are used by the chalcone synthase (CHS) in order to generate a bicyclic chalcone as naringenin chalcone [47]. Chalcones are substrates for chalcone isomerase (CHI), which carries out the B-ring closure at these compounds, rendering flavanones (as naringenin from citrus fruits) (Figure 4). All flavonoid subfamilies derive

from these 15C flavanones. Other phenylpropanoid enzymes will generate diverse final products as shown in Figure 4 [47].

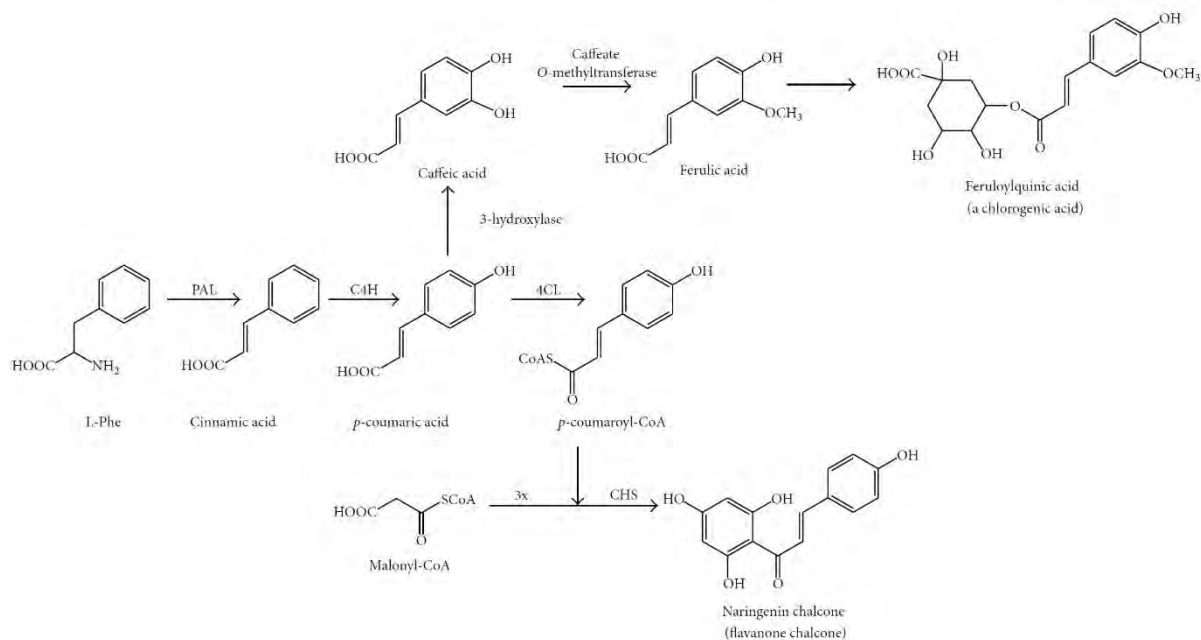


Figure 4. Biosynthetic steps for generation of flavonoid subfamilies [47]

Flavone synthase (FNS) will generate flavones (as apigenin from celery). Isoflavone synthase (IFS) will generate isoflavones (as genistein from soy). Flavanone-3-hydroxylase (F3H) will generate dihydroflavonols (as aromadendrin from pine trees). Flavonol synthase (FLS) will generate flavonols (as quercetin from onion or kaempferol from capers). Dihydroflavonol reductase (DFR) and anthocyanin synthase (ANS) will generate anthocyanidins (as pelargonidin from diverse red flowers). Anthocyanidin reductase (ANR) will generate flavan-3-ols (as epicatechin from cocoa).

Epicatechins

Cocoa (*Theobroma cacao* L., Sterculiaceae) is a widely consumed food ingredient. Although typically found in high-fat, high-sugar foods such as dark chocolate, cocoa is rich in polyphenols, methylxanthines, and monounsaturated fatty acids. There is increasing evidence that moderate consumption of cocoa and cocoa-containing foods may have beneficial effects on the health including vasodilatory, antioxidant, and anti-inflammatory effects [52]. The primary polyphenols present in cocoa are monomeric

((-)-epicatechin [EC] and (+)catechin) as well as oligomeric and polymeric (proanthocyanidin [PAC]) flavanols [52].

Interest in the effect of cocoa on cardiovascular diseases (CVD) began with observations among the Kuna Indian population in the San Blas Islands of Panama. This group had distinctively low rates of hypertension and CVD, coupled with an absence of the age-related increases in blood pressure (BP) observed in other populations [53], [54]. Environmental, rather than genetic, factors appeared to confer this protective role [53], [54]. Secondly, cocoa flavanols have been shown to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE) activity, and hence reduce blood pressure [55], [56]. Thirdly, there is evidence that suggest cocoa flavanols to have an indirect antioxidant effect within the cardiovascular system, upregulating NO-synthase activity and hence reducing blood pressure [57].

More recently, the study by Alkerwi et. al [58] examined the association of dark chocolate consumption with insulin resistance and serum liver enzymes in a national sample of adults in Luxembourg. The study reported an independent inverse relationship between daily dark chocolate consumption (100 mg dose) and levels of serum insulin (reduction by 0.16 $\mu\text{g/l}$), HOMA-IR (reduction by 0.16) (homoeostasis model assessment of insulin resistance) and liver enzymes in adults (reduction by 0.10 mg/l), suggesting that dark chocolate consumption may improve liver enzymes and protect against insulin resistance, a well-established risk factor for cardiometabolic disorders. The most common flavanol found in cocoa, epicatechin, is rapidly absorbed in humans and is detectable in blood plasma already 30 min after intake. The epicatechin levels peak 2–3 h after intake, exhibiting a strong positive correlation with the dose of ingested dark chocolate [59].

Similarly, comprehensive experimental evidence has demonstrated that cocoa-derived monomeric ((-)-epicatechin and (+)-catechin) and dimeric flavanols reduce NF- κ B activation thus resulting in reduced IL2 production and oxidative burst [60]. There is also consistent data on the protection of LDL particles against oxidation by cocoa flavanols [61].

The challenge remains that scientific data confirming beneficiary effects of cocoa epicatechins has been evidenced for high doses of cocoa solids (equivalent of minimum of 80-100 g of dark chocolate per day), which practically rules out the preventive daily use of epicatechins in a form of regular dark chocolate.

Effects on skin

Cocoa polyphenols have a positive effect on skin structure when applied for at least 5 days. Studying these effects *ex vivo*, Gasser et al. [62] observed that cocoa polyphenols exhibit a positive action on the parameters assessed, including glycosaminoglycans and collagens I, III, and IV, associated with skin tone and elasticity.

Cross-over studies conducted by Neukam et al. [63] proved also, that flavanol-rich cocoa consumption acutely increases dermal blood flow and oxygen saturation. The main component of the flavanol fraction were in that case epicatechins.

The ultraviolet A component of sunlight causes both acute and chronic damage to human skin. In this study the potential of epicatechin, an abundant dietary flavanol, and 3'-O-methyl epicatechin, one of its major *in vivo* metabolites, to protect against UVA-induced damage was examined using cultured human skin fibroblasts as an *in vitro* model. The results obtained clearly show that both epicatechin and its metabolite protect these fibroblasts against UVA damage and cell death. The hydrogen-donating antioxidant properties of these compounds are probably not the mediators of this protective response. The protection is a consequence of induction of resistance to UVA mediated by the compounds and involves newly synthesized proteins. This provides clear evidence that this dietary flavanol has the potential to protect human skin against the deleterious effects of sunlight [64]. There is also evidence that epicatechin containing cocoa powder attenuates UVB-induced skin wrinkling by the regulation of genes involved in dermal matrix production and maintenance. CP also elicited anti-wrinkle effects via inhibition of UVB-induced MMP-1 expression in both the human skin equivalent model and human dermal fibroblasts (HDFs). Inhibition of UVB-induced AP-1 via CP supplementation is likely to affect the expression of MMP-1. These results suggest that cacao extract may offer a protective effect against photoaging by inhibiting the breakdown of dermal matrix, which leads to an overall reduction in wrinkle formation [65].

Astacelle technology - background

Astacelle is specially developed to increase bioavailability of carotenoids and epicatechins to the organism. This is achieved through the pre-micellised form which acts

as a chaperone which enhances the incorporation of substances into mixed lipid micelles in gastrointestinal (GI) tract. The technology utilises the fact that there is no enzymatic degradation of astaxanthin in the GI tract. This provides protection of the molecules incorporated to the astacelles from oxidation by stomach acidity, or modification by intestinal enzymes. Furthermore, these pre-micelles have improved diffusion to enterocytes and incorporation into chylomicrons. Therefore, this would allow absorbed astaxanthin and epicatechins to be re-directed from being transported by the portal vein to lymph system. This would help to minimise their metabolic transformation by the liver, and support higher level of efficacy of the unmodified circulating bioactives [66]. Astacelles are structurally reverse and/or straight micelles, or their clusters/complexes of astaxanthin and cargo molecules; they are functionally vectors which protect and transport different molecules in their oral administration.

The core of the technology is the co-crystallization process of epicatechins in the astaxanthin micelles during the tempering process. That patent pending method provides a certain size and concentration of protected epicatechin crystals, which are not present in regular dark chocolate. Proprietary methodology, which allows to measure these parameters, and which are only within a certain range can guarantee increased biological and clinical efficacy, is the basis of the quality control process. This process performed in the company Cambridge based laboratory, and called Cambridge Chocolate Pass. The certification is applied for every new batch of supplied dark chocolate.

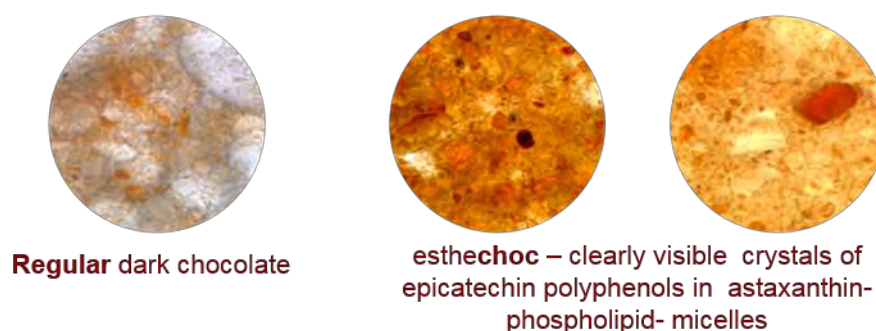


Figure 5. Epicatechin-rich dark chocolate crystals in regular dark chocolate and protected by astacelles in Esthechoc

Comparison of epicatechin-rich dark chocolate crystals in regular dark chocolate and esthechoc is presented on Figure 5.

The outcome of this is the increase in delivery of molecules to the point of absorption in the intestine, in their unmodified forms i.e. increase in bioavailability.

The efficacy of Astacelle technology has been validated and confirmed in a number of clinical studies including a dose dependency one and randomised, double blind, controlled trials. A diagram presenting the progress of research and development of Esthechoc is shown on Figure 6

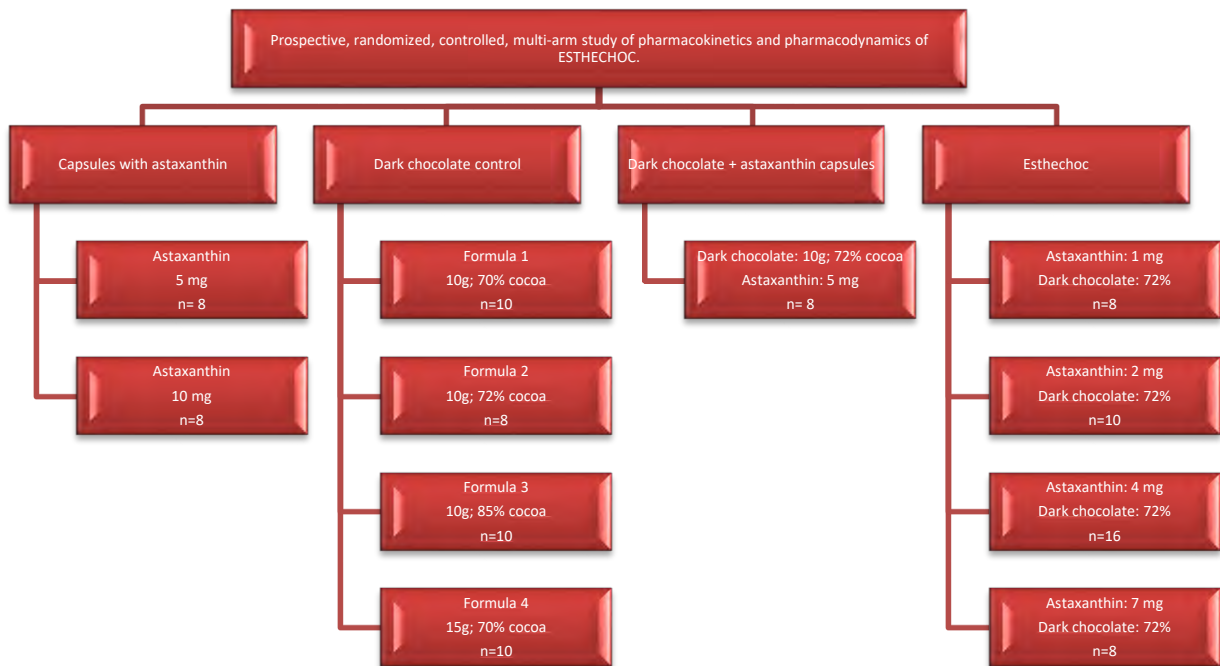


Figure 6. Graphical representation of Esthechoc clinical development

Objective

The purpose of these studies was to assess anti-ageing properties of Esthechoc (functional dark chocolate with astaxanthin-phospholipid micelles (astacelles) embedded epicatechins) in clinic. Target parameters were:

- biomarkers of ageing in blood, markers of sub-clinical oxidation and sub-clinical inflammation;
- age-associated sub-clinical peripheral tissue hypoxia and reduction of oxygen saturation in skin

Materials and Methods

Study design

The study was conducted by Lycotec Ltd., Cambridge UK. The protocol was approved by the local ethics committee. All patients were informed about the purpose of the study and have given written consent regarding their participation in the study.

Inclusion/Exclusion Criteria

All ESTHECHOC and control dark chocolate groups were double blind. The dark chocolate with Astaxanthin capsules group was open label. Two control Astaxanthin capsule groups were also double blind.

The duration of the trial for each arm was 4 weeks.

All participants were asked to abstain for a week prior to and during the trial from consumption of any chocolate or cocoa bean products, apart from samples received in the study, and also from all seafood and any fish containing Astaxanthin.

Patient's eligibility for the study was determined by the following inclusion/exclusion criteria:

Inclusion criteria

- Caucasian male or female subjects 45–70 years old.
- Signed informed consent.
- Non- or light-to-moderate smokers (≤ 10 cigarettes daily).
- Serum positive on presence of markers of inflammation and oxidation, LDL-Px ELISA ≥ 200 , and oxidation, IOD ≥ 40 $\mu\text{M}/\text{mL}$ MDA.
- No antihypertensive, lipid-lowering or any other cardiovascular drugs.
- Willingness and ability to comply with the protocol for the duration of the study.

Exclusion criteria

- Unwillingness to sign informed consent.
- Unable to comply with the protocol for the duration of the study.
- History of MI in the 3 months preceding the study.
- Ejection fraction (EF) $< 45\%$.
- Significant medical condition that would impact safety considerations (e.g., significantly elevated LFT, hepatitis, severe dermatitis, uncontrolled diabetes,

- cancer, severe GI disease, fibromyalgia, renal failure, recent CVA (cerebrovascular accident), pancreatitis, respiratory diseases, epilepsy, etc.).
- Compulsive alcohol abuse (>10 drinks weekly), or regular exposure to other substances of abuse.
- Participation in other nutritional or pharmaceutical studies.
- Resting heart rate of >100 beats per minute or <45 beats per minute.
- Positive test for tuberculosis, HIV, or hepatitis B.
- Intolerance to phlebotomy.
- Intolerance to dark chocolate.
- On a special diet in the 4 weeks prior to the study (e.g., liquid, protein, raw food, etc.)

Dark chocolate and astaxanthin products

Dark chocolate Control

Four different dark chocolate with 70 or 72.5% cocoa were used produced control and EstheChoc samples, Green & Black's Organic (GB), Vernost Kachestvu (VK) RF, Solo, Poland, and Master Martini, Italy.

For postprandial pharmacokinetics studies different size of dark chocolate bars was used from 10 to 20 to 30 to 50 and 100 grams.

In one month studies dark chocolate bar samples were of 10g in every group.

Astacelle

is a dark chocolate formulation where astaxanthin forms reverse micelles, or a film, or a layer which can protect bioactives in dark chocolate micelles or crystals. Due to the different fat content and composition of the dark chocolate products, different proprietary protocols were used for the blending of specific astaxanthin premixes and subsequent cooling down and tempering. That lead to the formation of dark chocolate embedded astaxanthin-polyphenol micelles. The total amount of astaxanthin in the single dose was 1, 2, 4 or 7 mg.

Astaxanthin control

Control capsules contained 5 or 10 mg of astaxanthin.

Inflammatory Oxidative Damage (IOD)

Reactive oxygen species degrade polyunsaturated lipids, forming malondialdehyde [41]. This compound is a reactive aldehyde and is one of the many *reactive electrophile species* that cause toxic stress in cells and form covalent protein adducts referred to as advanced lipoxidation endproducts. The production of this aldehyde is used as a biomarker to measure the level of oxidative stress in an organism [48], [49]. Method described here provides lower pH, which enables to measure oxidative damage in the conditions, which naturally occur during progression of inflammation.

Plasma samples were incubated overnight in 0.05M PBS acetate buffer (pH 5.6), which would imitate the type of oxidative damage which occurs during the release of lysosomes following neutrophil degranulation. The following morning, the reaction was terminated using trichloroacetic acid. The concentration of the end products such as malondialdehyde (MDA), and other possible thiobarbituric acid reactive substances, TBARS, was then measured by colorimetric methods [67] using reagents and kits from Cayman Chemical (MC, USA).

LDL-Px

Activity of serum LDL peroxidase proteins, which include IgG with superoxide dismutase activity [68], was measured as described by Petyaev et al [69].

Oxidation of plasma lipoproteins turns them into highly atherogenic products, which are a major cause of atherosclerosis. Test used during this research uses a new class of lipid oxidising antibodies, LDL-Px, as a key factor in developing plasma/serum lipoprotein oxidation and has demonstrated strong correlations between the presence of LDL-Px and active atherogenesis and its clinical manifestation in cardiovascular diseases, including coronary and cerebral arterial stenosis. LDL-Px are specific antibodies which not only react with lipoproteins, but furthermore have the unique feature of being enzymatic catalysts capable of causing oxidation of lipids in low density lipoprotein particles. The appearance of LDL-Px in the circulation will lead to the conversion of plasma lipoproteins into oxidised highly atherogenic products with a tendency for aggregation and deposition on the arterial wall. LDL-Px activity is determined by comparing the amount of antibody bound to a target antigen in an untreated sample with the amount bound in a sample treated to inhibit the enzymatic

activities of the LDL-Px. The target antigen is one that can be oxidised and destroyed by LDL-Px activity.

Antihuman antibodies conjugated with HRP (horse radish peroxidase) were used to measure the level of IgG. The measurements were conducted spectrophotometrically and final results are presented below in Results section.

Plasma Oxygen Transport

Molecular oxygen is more soluble in lipids than in aqueous solutions. Up to 25% of total oxygen present in whole blood is within the lipid fraction of plasma. A comparison of the measurement of lipid –associated oxygen with the conventional electrochemical system for measuring oxygen levels suggests that the measurement of lipid associated oxygen is a better reflection of the oxygen supplied [114]. Having that in mind we tested plasma oxygen transport after supplementation with different formulations.

Plasma was prepared from the blood obtained from healthy volunteers. Lipoprotein fractions were obtained from plasma by centrifugation to prepare micellar solutions. A mixture of NADH and PMS was used to produce of superoxides which were monitored spectrophotometrically by a colorimetric reaction of NBT to monoformazan reduction according to reaction presented below.



Tissue Oxygen Saturation

As a tissue target for the assessment of oxygen saturation, StO₂, or combined level of oxygenated haemoglobin and myoglobin, thenar eminence and forearm muscles of the patients were used. StO₂ was analysed by continuous wavelength nearinfrared spectroscopy, NIRS, with widgap secondderivative (In Spectra, Hutchinson Technology, MN, USA). The measurements were made at different time points. The recording was started after 15min of rest in a supine position before occlusion of the brachial artery. It was then continued during stagnant ischemia induced by rapidly inflating the cuff to 50mmHg above systolic BP. The ischemia lasted for 3 min, and the recording period lasted for another 5 min after that until StO₂ was stabilized [72], [73].

Then the area under the hyperaemic curve, AUC, of the recorded signal for the settling time in the postocclusion period was calculated as described earlier in % O₂/minute [74][67]

Blood Collection

Blood was collected in the morning after night fast from arm veins of the patients. The plasma was separated from the rest of the clotted mass by centrifugation, then aliquots were stored at -80°C prior to analysis.

Statistics

For the assessment of normally distributed parameters, the ShapiroWilk method was used. Student's *t* test was then applied both for paired and unpaired samples. In cases where parameters were not normally distributed MannWhitney *U* test and KruskalWallis test were used. ANOVA and ANCOVA were used with post hoc analysis (Statistica 9 suit, StatSoft; Inc.). Statistical significance between twotailed parameters was considered to be $P < 0.05$.

Results

Epicatechins

Superior efficacy of Astacelle fortified Dark Chocolate over traditional was demonstrated in three randomised, double blind, crossover or bioequivalency clinical trials on 50 persons.

Pharmacokinetics

In this particular experiment only 5% of Cocoa Flavonols of 100 g of a Dark Chocolate bar were embedded into Astacelles. However, ingestion of this dark chocolate resulted in almost 2 fold increase of the epicatechins in the serum. This indicates that bioavailability of the Cocoa Epicatechins was significantly increased by Astacelles by up to 10 fold assuming 50% incorporation of polyphenols into Astacelles. Results are shown on Figure 7.

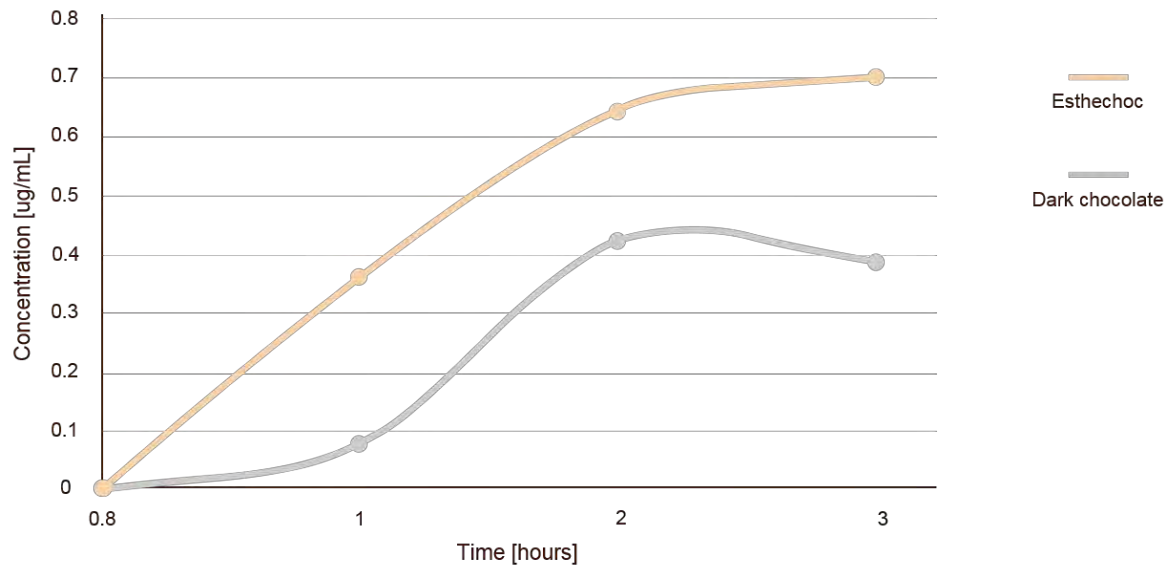


Figure 7. Pharmacokinetics of total epicatechin concentration in the serum of the same person obtained from cross-over study from the same individual after 1h of ingestion of 100g of Dark Chocolate with (grey line) or without (gold line) Astacelles.

Astaxanthin (ESTHECHOC)

Pharmacokinetics

A prospective study of 4 weeks of pharmacokinetics of Astaxanthin, randomized in all groups, double-blind within capsules and dark chocolate groups.

Total number of participants – 66, 34 males and 32 females, with a target age range of 45 to 70 years old.

24 persons were in the control groups, and 42 were in the ESTHECHOC groups.

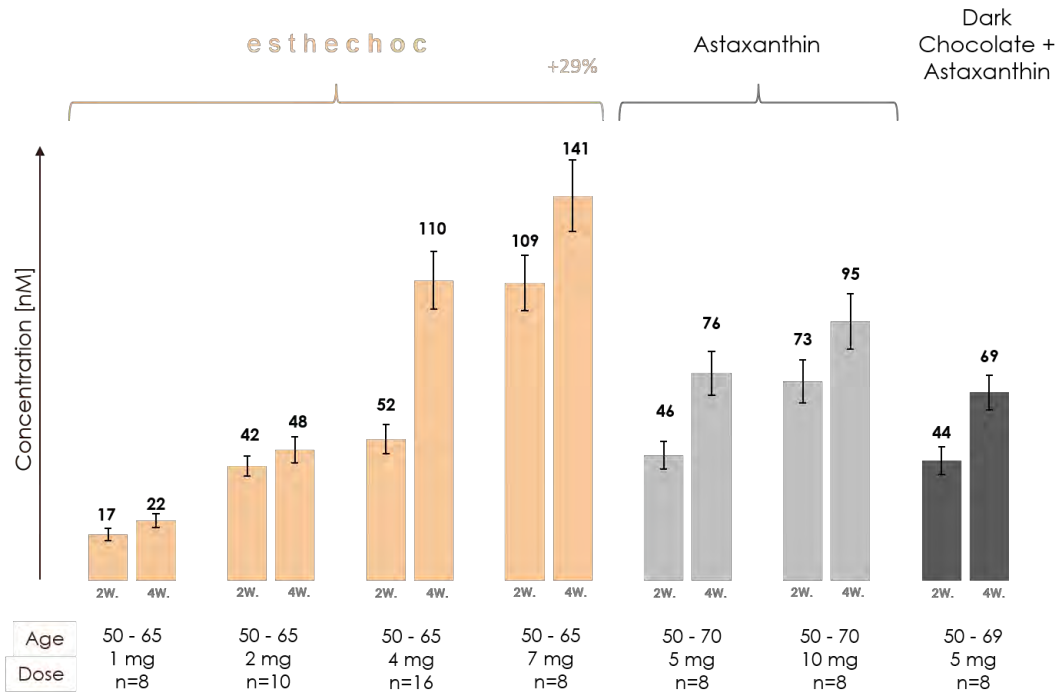


Figure 8. Pharmacokinetics of astaxanthin from different products [nM]
 Serum level supplementation; Addenbrooke's Hospital, Cambridge University Hospitals.

Data on Figure 8 show comparison of two different products containing astaxanthin, dark chocolate and astaxanthin as well as 4 versions of ESTHECHOC. There was a good dose-dependency in absorption of Astaxanthin both in the capsule form and in the ESTHECHOC formulation. The absorption level of Astaxanthin capsules taken together with the dark chocolate was no different from when it was taken in capsules alone. The absorption level of Astaxanthin from ESTHOCHOC was significantly higher than when it was taken either in capsule form alone or together with the dark chocolate. The biggest increase in astaxanthin level was in the case of ESTHECHOC with added 4 mg of astaxanthin.

Pharmacodynamics

A prospective study of 4 weeks of pharmacodynamics of ESTHOCHOC was randomized, controlled and double-blind within capsule only and dark chocolate only groups. Only one out of three control groups, dark chocolate plus capsule, had an open label.

Total number of participants – 104, 53 males and 51 females, with a target age range of 45 to 70 years old.

62 persons were in the control groups, and 42 were in ESTHECHOC groups.

There were three control groups:

- 1) capsules only - 16 persons,
- 2) dark chocolate only, the same dark chocolate which was used to make ESTHECHOC – 38 persons,
- 3) dark chocolate plus 1 capsule of 5mg Astaxanthin – 8 persons.

Inflammatory Oxidative Damage reduction

Because of the anti-inflammatory properties of carotenoids, also the decrease in damage caused by oxidative stress was measured. Method which best imitates slightly acidic environment (pH 5,6) caused by neutrophile degranulation was used to visualize this activity.

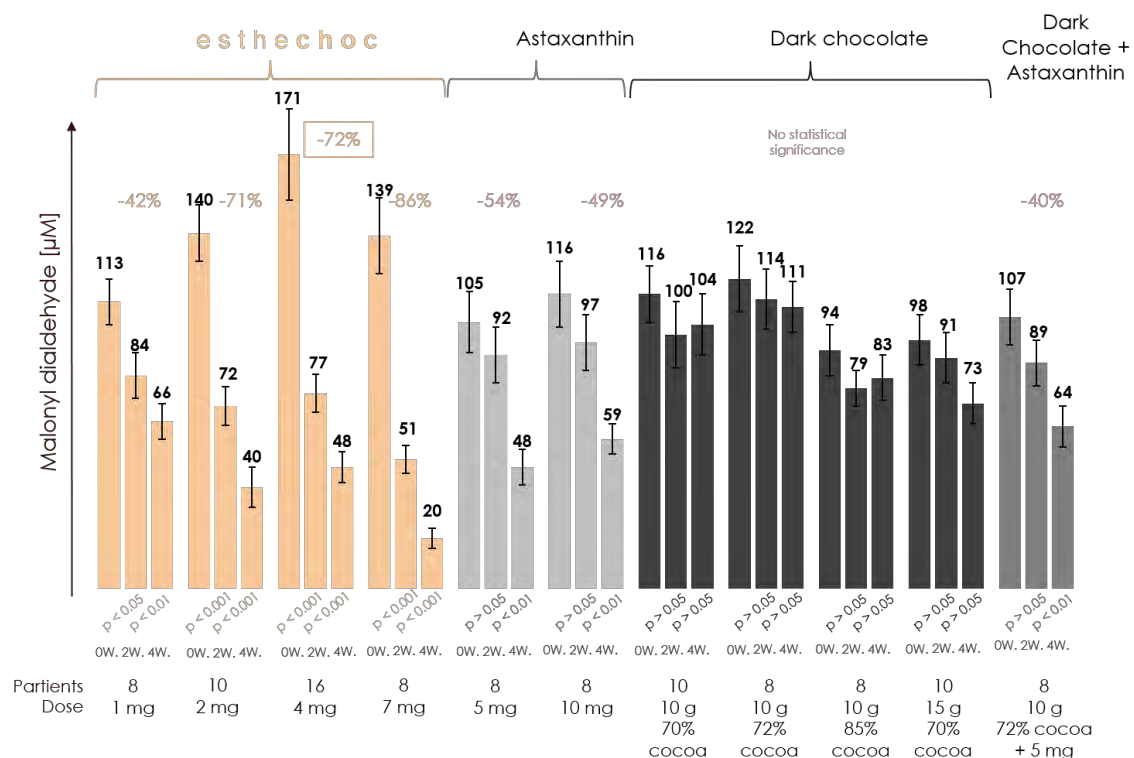


Figure 9. Inflammatory Oxidative Damage reduction in MDA uM
4 weeks clinical trial in ; Addenbrooke's Hospital, Cambridge University Hospitals.

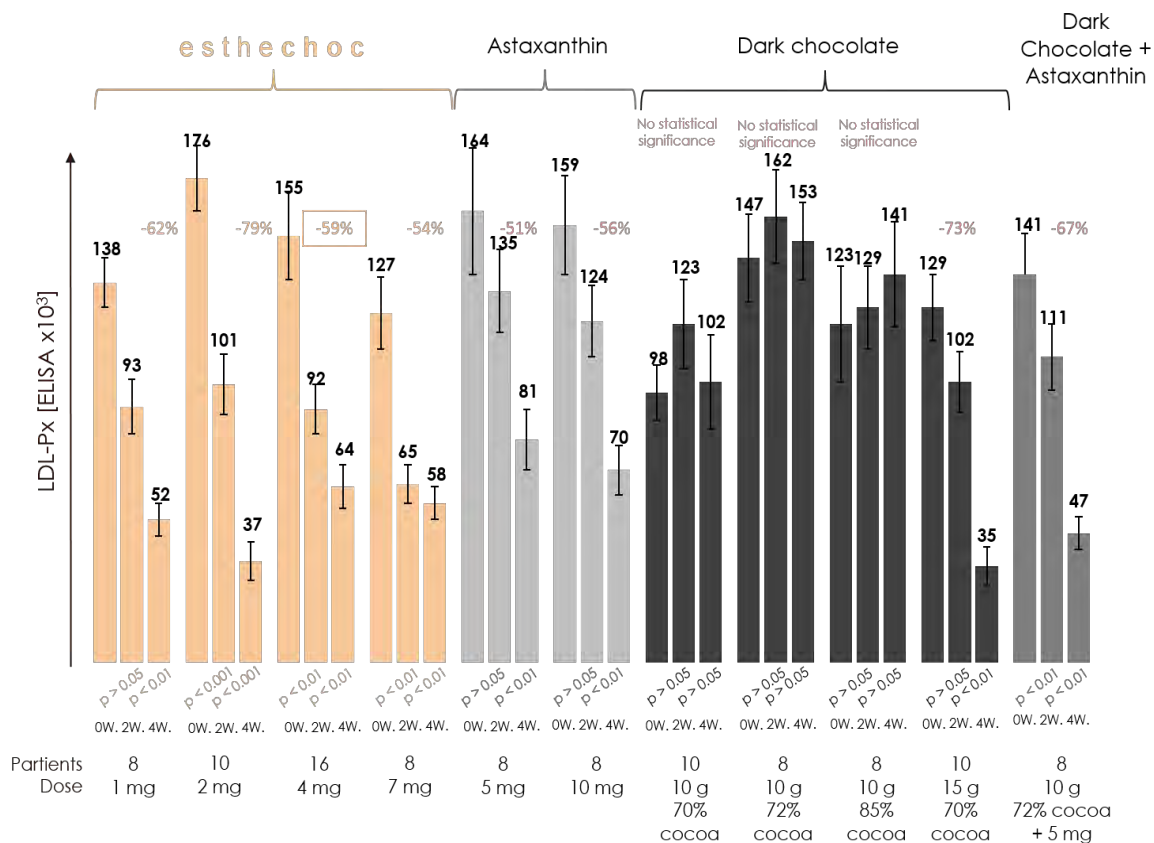


Figure 10. IOD: LDL-Px in ELISA x10³

4 weeks clinical trial in; Addenbrooke's Hospital, Cambridge University Hospitals.

A noticeable dose-dependency was observed between an ingested amount of Astaxanthin in ESTHECHOC and the level of inhibition of acidic oxidative damage (Figure 9). For the capsule formulation this dependency was not observed.

Moreover, the level of antioxidant activity of ESTHECHOC with 4 mg of Astaxanthin was not only higher than 5mg but even 10mg of this carotenoid in the capsule form.

There was no dose dependency between Astaxanthin concentration and anti-inflammatory activity (Figure 10). This may indicate that the anti-inflammatory activity of this carotenoid is of indirect nature and could be a result of some metabolic pathways which could be activated by its antioxidant activity.

However, the changes in the anti-inflammatory activity (expressed as LDL oxidation activity) were related in an apparent dose-dependent manner to the ingested amount of the dark chocolate in the control groups. This may indicate that cocoa bioactive molecules such as polyphenols also have anti-inflammatory properties.

Plasma Oxygen Transport

Molecular oxygen is more soluble in lipids than in aqueous solutions. Up to 25% of total oxygen present in whole blood is within the lipid fraction of plasma. A comparison of the measurement of lipid –associated oxygen with the conventional electrochemical system for measuring oxygen levels suggests that the measurement of lipid associated oxygen is a better reflection of the oxygen supplied [70]. Having that in mind plasma oxygen transport was tested after supplementation with two different formulations with astaxanthin. Results are shown on Figure 11.

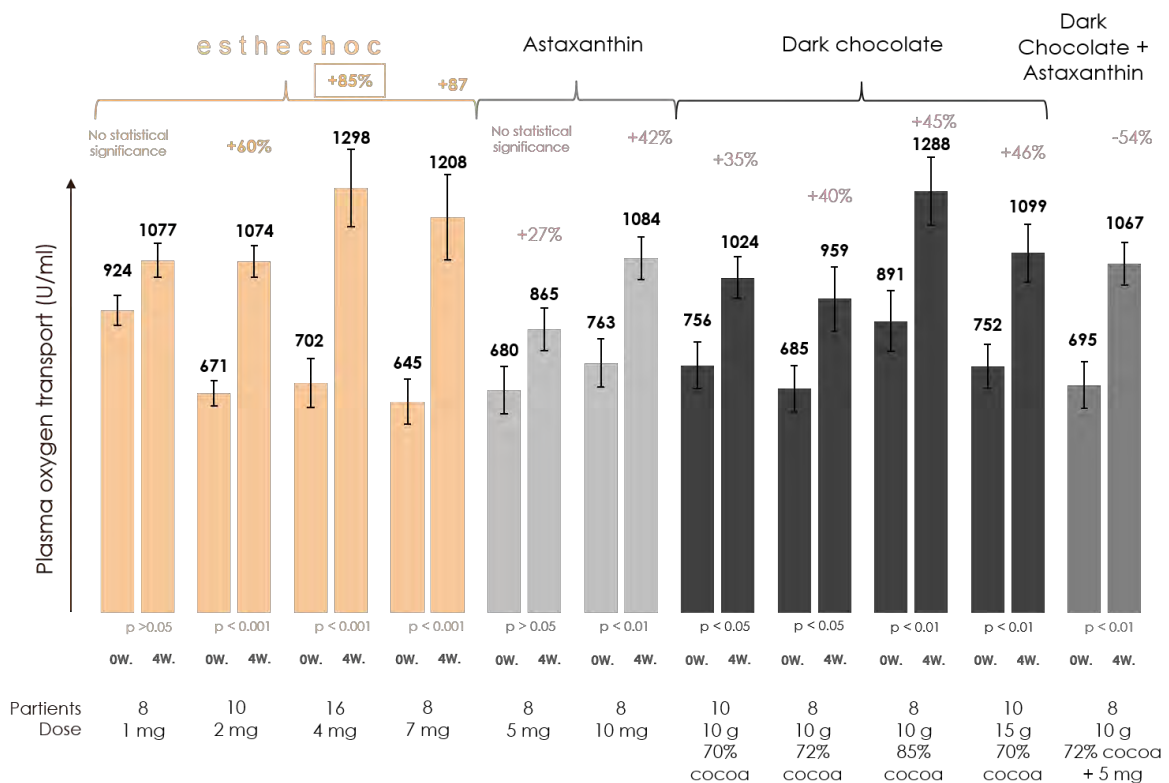


Figure 11. Plasma Oxygen Transport change after astaxanthin supplementation

4 weeks clinical trial in ; Addenbrooke's Hospital, Cambridge University Hospitals.

There was a good dose-dependency between the amount of ingested Astaxanthin and the level of the increase of plasma oxygen concentration. This was observed for both forms of the carotenoid, whether it was in capsule or in ESTHECHOC.

The level of the increase of the plasma oxygen for 4mg of the ESTHECHOC Astaxanthin was significantly higher than in the group, which had taken 5mg of the capsules together with the control dark chocolate.

It was interesting that although the daily intake of the dark chocolate in the control groups resulted in an increase of the level of plasma oxygen, there was no apparent dose dependency between its ingested amount and the changes in the parameter. There was a slight increase in tissue oxygen saturation in these groups but it was statistically insignificant.

Tissue Oxygen Saturation: StO₂, in AUC mm

The ultimate test for oxygen availability and mitochondrial respiration was the measurement of efficacy of tissue oxygen saturation. The results are shown on the Figure 12 confirmed the efficacy of ESTHECHOC as the nutraceutic enhanced tissue oxygen saturation up to 59% after 4 weeks of supplementation.

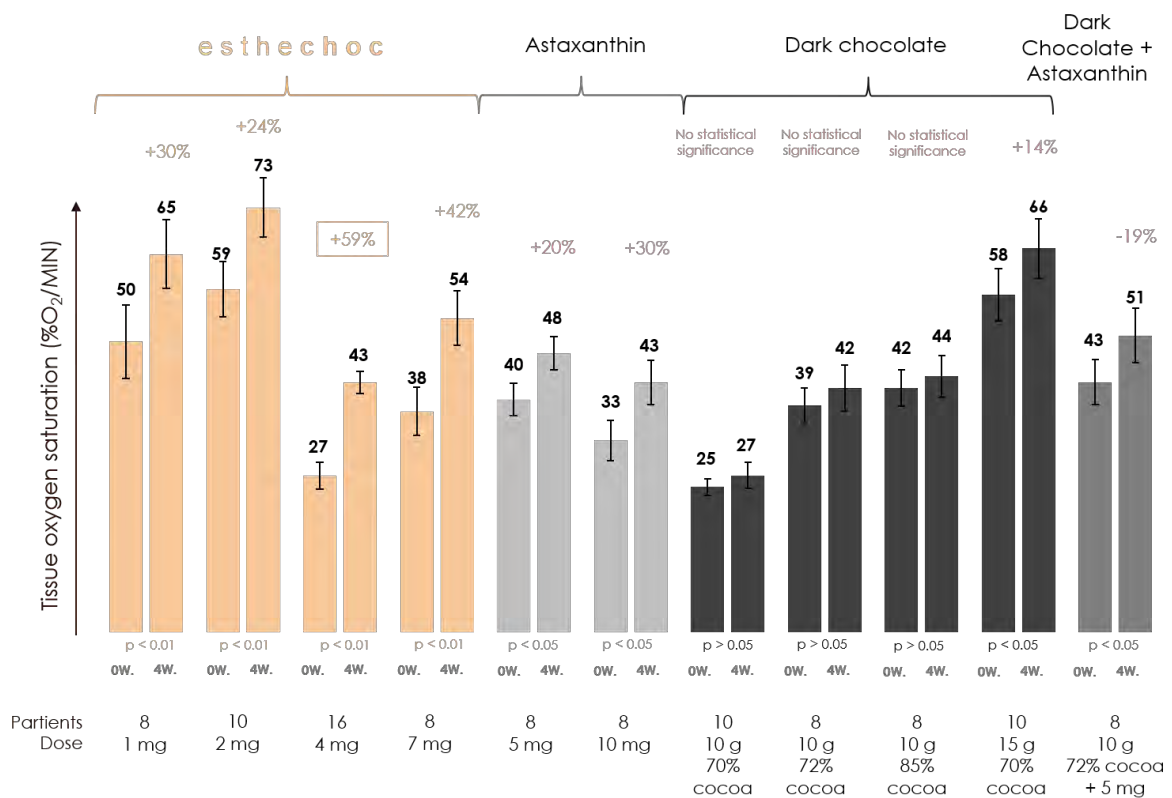


Figure 12. Tissue Oxygen Saturation

4 weeks clinical trial in Addenbrooke's Hospital, Cambridge University Hospitals.

In the ESTHECHOC groups there was a significant boost in StO₂, significantly stronger than in case of Astaxanthin capsules, regular dark chocolate or Astaxanthin capsules combined with dark chocolate. There was no dose dependency between the ingested concentration of the Astaxanthin in Esthechoc dark chocolate and changes in the tissue oxygen saturation. These results may indicate that this could be a beneficial consequence of improvement of some other metabolic targets of this carotenoid.

Conclusions

The prospective, randomised, controlled set of clinical studies on 104 persons 45-70 y.o., positive on the presence of blood markers of subclinical inflammation and oxidation, showed that administration of ESTHECHOC for 4 weeks had a significant inhibitory effect on the level of these parameters.

These positive changes were accompanied by improvement of plasma oxygen transport and peripheral tissue oxygenation.

These data demonstrate that ESTHECHOC can not only effectively inhibit oxidative and inflammatory markers but also improve age-associated depression of the oxygen parameters of the peripheral tissues, including skin.

Clinical efficacy of ESTHECHOC was more profound than when its ingredients were administered at the same doses but separately.

The superior pharmacokinetics and pharmacodynamics were presumably due to the synergy and enhanced efficacy of composite bioactives created by ESTHECHOC co-crystallisation technology.

Bibliography

- [1] N. I. Krinsky, "The antioxidant and biological properties of the carotenoids.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 854, pp. 443–7, Nov. 1998.
- [2] A. J. Young and G. M. Lowe, "MINIREVIEW Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 385, no. 1, pp. 20–27, 2001.
- [3] H. Sies and W. Stahl, "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids

- as antioxidants.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 62, p. 1315S–1321S, 1995.
- [4] W. Stahl, S. Nicolai, K. Briviba, M. Hanusch, G. Broszeit, M. Peters, H. D. Martin, and H. Sies, "Biological activities of natural and synthetic carotenoids: Induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching," *Carcinogenesis*, vol. 18, pp. 89–92, 1997.
- [5] Y. Sharoni, M. Danilenko, N. Dubi, A. Ben-Dor, and J. Levy, "Carotenoids and transcription," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 430. pp. 89–96, 2004.
- [6] L. Yonekura and A. Nagao, "Intestinal absorption of dietary carotenoids," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 107–115, Jan. 2007.
- [7] R. S. Parker, J. E. Swanson, C. S. You, A. J. Edwards, and T. Huang, "Bioavailability of carotenoids in human subjects.," *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 58, pp. 155–162, 1999.
- [8] R. M. Faulks and S. Southon, "Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability," in *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2005, vol. 1740, pp. 95–100.
- [9] I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea, "Astaxanthin: a review of its chemistry and applications.," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 46, pp. 185–196, 2006.
- [10] F. J. Pashkow, D. G. Watumull, and C. L. Campbell, "Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease.," *Am. J. Cardiol.*, vol. 101, p. 58D–68D, 2008.
- [11] Y. Yang, B. Kim, and J. Lee, "Astaxanthin Structure , Metabolism , and Health Benefits," *J. Hum. Nutr. Food Sci.*, vol. 1, no. 1003, pp. 1–11, 2013.
- [12] R. Sarada, U. Tripathi, and G. Ravishankar, "Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions," *Process Biochem.*, vol. 37, pp. 623–627, 2002.
- [13] P. Kidd, "Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential," *Alternative Medicine Review*, vol. 16. pp. 355–364, 2011.
- [14] M. Guerin, M. E. Huntley, and M. Olaizola, "Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition," *Trends in Biotechnology*, vol. 21. pp. 210–216, 2003.
- [15] *Astaxanthin (Natural Astaxanthin: King of the Carotenoids)*, First edit. Kona-Kailua: Cyanotech Corporation, 2007.

- [16] E. Yamashita, "Astaxanthin as a Medical Food," *Funct. Foods Heal. Dis.*, vol. 3, no. 7, pp. 254 – 258, 2013.
- [17] Y. M. A. Naguib, "Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, pp. 1150–1154, 2000.
- [18] R. G. Fassett and J. S. Coombes, "Astaxanthin in cardiovascular health and disease," *Molecules*, vol. 17. pp. 2030–2048, 2012.
- [19] N. Shimidzu, M. Goto, and W. Miki, "Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms," *Fish. Sci.*, vol. 62, pp. 134–137, 1996.
- [20] A. R. Rao, H. N. Sindhuja, S. M. Dharmesh, K. U. Sankar, R. Sarada, and G. A. Ravishankar, "Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *haematococcus pluvialis*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, pp. 3842–3851, 2013.
- [21] A. Ranga Rao, V. Baskaran, R. Sarada, and G. A. Ravishankar, "In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass - A repeated dose study," *Food Res. Int.*, vol. 54, pp. 711–717, 2013.
- [22] B. S. Kamath, B. M. Srikanta, S. M. Dharmesh, R. Sarada, and G. A. Ravishankar, "Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 590, pp. 387–395, 2008.
- [23] J. S. Park, J. H. Chyun, Y. K. Kim, L. L. Line, and B. P. Chew, "Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans.," *Nutr. Metab. (Lond)*, vol. 7, p. 18, 2010.
- [24] D. D. Haines, B. Varga, I. Bak, B. Juhasz, F. F. Mahmoud, H. Kalantari, R. Gesztelyi, I. Lekli, A. Czompa, and A. Tosaki, "Summative interaction between astaxanthin, Ginkgo biloba extract (EGb761) and vitamin C in Suppression of respiratory inflammation: A comparison with ibuprofen," *Phyther. Res.*, vol. 25, pp. 128–136, 2011.
- [25] S. Hama, K. Takahashi, Y. Inai, K. Shiota, R. Sakamoto, A. Yamada, H. Tsuchiya, K. Kanamura, E. Yamashita, and K. Kogure, "Protective effects of topical application of a poorly soluble antioxidant astaxanthin liposomal formulation on ultraviolet-induced skin damage," *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, pp. 2909–2916, 2012.
- [26] K. Uchiyama, Y. Naito, G. Hasegawa, N. Nakamura, J. Takahashi, and T. Yoshikawa, "Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice.," *Redox Rep.*, vol. 7, pp. 290–293, 2002.

- [27] R. Otton, D. P. Marin, A. P. Bolin, R. de C. M. dos Santos, T. G. Polotow, S. C. Sampaio, and M. P. de Barros, "Astaxanthin ameliorates the redox imbalance in lymphocytes of experimental diabetic rats," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 186, pp. 306–315, 2010.
- [28] I. Nishigaki, P. Rajendran, R. Venugopal, G. Ekambaram, D. Sakthisekaran, and Y. Nishigaki, "Cytoprotective role of astaxanthin against glycated protein/iron chelate-induced toxicity in human umbilical vein endothelial cells," *Phyther. Res.*, vol. 24, pp. 54–59, 2010.
- [29] S. Bhuvanewari, E. Arunkumar, P. Viswanathan, and C. V. Anuradha, "Astaxanthin restricts weight gain, promotes insulin sensitivity and curtails fatty liver disease in mice fed a obesity-promoting diet," *Process Biochem.*, vol. 45, pp. 1406–1414, 2010.
- [30] Y. J. Kim, Y. A. Kim, and T. Yokozawa, "Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, pp. 8793–8797, 2009.
- [31] R. G. Fassett and J. S. Coombes, "Astaxanthin: A potential therapeutic agent in cardiovascular disease," *Marine Drugs*, vol. 9, pp. 447–465, 2011.
- [32] T. Iwamoto, K. Hosoda, R. Hirano, H. Kurata, A. Matsumoto, W. Miki, M. Kamiyama, H. Itakura, S. Yamamoto, and K. Kondo, "Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin.," *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 7, pp. 216–222, 2000.
- [33] J. Monroy-Ruiz, M.-Á. Sevilla, R. Carrón, and M.-J. Montero, "Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats.," *Pharmacol. Res.*, vol. 63, pp. 44–50, 2011.
- [34] S. K. Khan, T. Malinski, R. P. Mason, R. Kubant, R. F. Jacob, K. Fujioka, S. J. Denstaedt, T. J. King, H. L. Jackson, A. D. Hieber, S. F. Lockwood, T. H. Goodin, F. J. Pashkow, and P. F. Bodary, "Novel astaxanthin prodrug (CDX-085) attenuates thrombosis in a mouse model," *Thromb. Res.*, vol. 126, pp. 299–305, 2010.
- [35] G. Hussein, M. Nakamura, Q. Zhao, T. Iguchi, H. Goto, U. Sankawa, and H. Watanabe, "Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals.," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, pp. 47–52, 2005.
- [36] B. P. Chew, J. S. Park, M. W. Wong, and T. S. Wong, "A comparison of the anticancer activities of dietary ??-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in

- mice in vivo,” *Anticancer Res.*, vol. 19, pp. 1849–1853, 1999.
- [37] P. Palozza, C. Torelli, A. Boninsegna, R. Simone, A. Catalano, M. C. Mele, and N. Picci, “Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells,” *Cancer Lett.*, vol. 283, pp. 108–117, 2009.
- [38] H. Jyonouchi, S. Sun, K. Iijima, and M. D. Gross, “Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action.,” *Nutr. Cancer*, vol. 36, pp. 59–65, 2000.
- [39] P. N. Prabhu, P. Ashokkumar, and G. Sudhandiran, “Antioxidative and antiproliferative effects of astaxanthin during the initiation stages of 1,2-dimethyl hydrazine-induced experimental colon carcinogenesis,” *Fundam. Clin. Pharmacol.*, vol. 23, pp. 225–234, 2009.
- [40] R. Nakao, O. L. Nelson, J. S. Park, B. D. Mathison, P. A. Thompson, and B. P. Chew, “Effect of dietary astaxanthin at different stages of mammary tumor initiation in BALB/c mice.,” *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 6, pp. 2171–5, Jun. 2010.
- [41] M. Santocono, M. Zurria, M. Berrettini, D. Fedeli, and G. Falcioni, “Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 88, no. 1, pp. 1–10, 2007.
- [42] G. Hussein, U. Sankawa, H. Goto, K. Matsumoto, and H. Watanabe, “Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition.,” *J. Nat. Prod.*, vol. 69, no. 3, pp. 443–9, Mar. 2006.
- [43] W.-P. Chen, Y. Xiong, Y.-X. Shi, P.-F. Hu, J.-P. Bao, and L.-D. Wu, “Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase expression in human chondrocytes,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 19, no. 1, pp. 174–177, 2014.
- [44] K. Suganuma, H. Nakajima, M. Ohtsuki, and G. Imokawa, “Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts.,” *J. Dermatol. Sci.*, vol. 58, no. 2, pp. 136–42, May 2010.
- [45] E. Camera, A. Mastrofrancesco, C. Fabbri, F. Daubrawa, M. Picardo, H. Sies, and W. Stahl, “Astaxanthin, canthaxanthin and ??-carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes,” *Exp. Dermatol.*, vol. 18, no. 3, pp. 222–231, 2009.
- [46] P. J. Kindlund, “Astaxanthin,” *Nutrafoods*, vol. 10, no. 1, pp. 27–31, Jan. 2011.
- [47] L. Marín, E. M. Miguélez, C. J. Villar, and F. Lombó, “Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties.,” *Biomed*

Res. Int., vol. 2015, p. 905215, Jan. .

- [48] G. Agati, C. Brunetti, M. Di Ferdinando, F. Ferrini, S. Pollastri, and M. Tattini, "Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past," *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 72. pp. 35–45, 2013.
- [49] M. Mori, K. Yoshida, Y. Ishigaki, T. Matsunaga, O. Nikaido, K. Kameda, and T. Kondo, "UV-B protective effect of a polyacylated anthocyanin, HBA, in flower petals of the blue morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 13, pp. 2015–2020, 2005.
- [50] A. Sugiyama, N. Shitan, and K. Yazaki, "Involvement of a soybean ATP-binding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoid in legume-Rhizobium symbiosis.," *Plant Physiol.*, vol. 144, pp. 2000–2008, 2007.
- [51] T. Vogt, "Phenylpropanoid biosynthesis," *Mol. Plant*, vol. 3, pp. 2–20, 2010.
- [52] Y. Gu and J. D. Lambert, "Modulation of metabolic syndrome-related inflammation by cocoa," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 57. pp. 948–961, 2013.
- [53] M. L. McCullough, K. Chevaux, L. Jackson, M. Preston, G. Martinez, H. H. Schmitz, C. Coletti, H. Campos, and N. K. Hollenberg, "Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols.," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 47 Suppl 2, pp. S103–S109; discussion 119–121, 2006.
- [54] L. S. Latham, Z. K. Hensen, and D. S. Minor, "Chocolate-Guilty Pleasure or Healthy Supplement?," *J. Clin. Hypertens.*, vol. 16, pp. 101–106, 2014.
- [55] I. A. L. Persson, K. Persson, S. Hägg, and R. G. G. Andersson, "Effects of cocoa extract and dark chocolate on angiotensin-converting enzyme and nitric oxide in human endothelial cells and healthy volunteers--a nutrigenomics perspective.," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 57, pp. 44–50, 2011.
- [56] L. Actis-Goretta, J. I. Ottaviani, and C. G. Fraga, "Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pp. 229–234, 2006.
- [57] C. L. Keen, R. R. Holt, P. I. Oteiza, C. G. Fraga, and H. H. Schmitz, "Cocoa antioxidants and cardiovascular health.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 1 Suppl, p. 298S–303S, Jan. 2005.
- [58] A. Alkerwi, N. Sauvageot, G. E. Crichton, M. F. Elias, and S. Stranges, "Daily chocolate consumption is inversely associated with insulin resistance and liver enzymes in the Observation of Cardiovascular Risk Factors in Luxembourg

- study.," *Br. J. Nutr.*, pp. 1–8, Mar. 2016.
- [59] M. Richelle, I. Tavazzi, M. Enslin, and E. A. Offord, "Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate.," *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 53, pp. 22–26, 1999.
- [60] G. G. Mackenzie and P. I. Oteiza, "Modulation of transcription factor NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cell lines: effect of (-)-epicatechin.," *Free Radic. Res.*, vol. 40, pp. 1086–1094, 2006.
- [61] A. L. Waterhouse, J. R. Shirley, and J. L. Donovan, "Antioxidants in chocolate.," *Lancet*, vol. 348. p. 834, 1996.
- [62] P. Gasser, E. Lati, L. Peno-Mazzarino, D. Bouzoud, L. Allegaert, and H. Bernaert, "Cocoa polyphenols and their influence on parameters involved in ex vivo skin restructuring.," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 30, no. 5, pp. 339–45, Oct. 2008.
- [63] K. Neukam, W. Stahl, H. Tronnier, H. Sies, and U. Heinrich, "Consumption of flavanol-rich cocoa acutely increases microcirculation in human skin," *Eur. J. Nutr.*, vol. 46, no. 1, pp. 53–56, 2007.
- [64] S. Basu-Modak, M. J. Gordon, L. H. Dobson, J. P. E. Spencer, C. Rice-Evans, and R. M. Tyrrell, "Epicatechin and its methylated metabolite attenuate UVA-induced oxidative damage to human skin fibroblasts.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 35, no. 8, pp. 910–21, Oct. 2003.
- [65] J.-E. Kim, D. Song, J. Kim, J. Choi, J. R. Kim, H.-S. Yoon, J.-S. Bae, M. Han, S. Lee, J. S. Hong, D. Song, S.-J. Kim, M.-J. Son, S.-W. Choi, J. H. Chung, T.-A. Kim, and K. W. Lee, "Oral supplementation with cocoa extract reduces UVB-induced wrinkles in hairless mouse skin.," *J. Invest. Dermatol.*, Feb. 2016.
- [66] J. A. Yáñez, S. W. J. Wang, I. W. Knemeyer, M. A. Wirth, and K. B. Alton, "Intestinal lymphatic transport for drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 10–11. pp. 923–942, 2011.
- [67] H. Gómez, J. Mesquida, P. Simon, H. K. Kim, J. C. Puyana, C. Ince, and M. R. Pinsky, "Characterization of tissue oxygen saturation and the vascular occlusion test: influence of measurement sites, probe sizes and deflation thresholds.," *Crit. Care*, vol. 13 Suppl 5, p. S3, 2009.
- [68] K. Yagi, "Lipid peroxides and human diseases," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 45. pp. 337–351, 1987.
- [69] I. Petyaev, M. M. Mitchinson, J. V Hunt, and P. J. Coussons, "Superoxide dismutase activity of antibodies purified from the human arteries and

- atherosclerotic lesions.," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 26, no. 1, p. S43, Feb. 1998.
- [70] I. M. Petyaev, A. Vuylsteke, D. W. Bethune, and J. V Hunt, "Plasma oxygen during cardiopulmonary bypass: a comparison of blood oxygen levels with oxygen present in plasma lipid.," *Clin. Sci. (Lond)*., vol. 94, pp. 35–41, 1998.
- [71] I. M. Petyaev and J. V Hunt, "Micellar acceleration of oxygen-dependent reactions and its potential use in the study of human low density lipoprotein.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1345, no. 3, pp. 293–305, 1997.
- [72] A. Sifaka, E. Angelopoulos, K. Kritikos, M. Poriazi, N. Basios, V. Gerovasili, A. Andreou, C. Roussos, and S. Nanas, "Acute effects of smoking on skeletal muscle microcirculation monitored by near-infrared spectroscopy," *Chest*, vol. 131, pp. 1479–1485, 2007.
- [73] P. L. Madsen and N. H. Secher, "Near-infrared oximetry of the brain," *Prog. Neurobiol.*, vol. 58, pp. 541–560, 1999.
- [74] R. Bezemer, A. Lima, D. Myers, E. Klijn, M. Heger, P. T. Goedhart, J. Bakker, and C. Ince, "Assessment of tissue oxygen saturation during a vascular occlusion test using near-infrared spectroscopy: the role of probe spacing and measurement site studied in healthy volunteers.," *Crit. Care*, vol. 13 Suppl 5, p. S4, 2009.

Rechoc – polyphenol enriched dark chocolate

Abstract

Polyphenols are a large group of plant secondary metabolites which are present in human diet in many cultures for ages and their impact on human health is undeniable.

Epicatechins (found in cacao beans), resveratrol (from red wine) and anthocyanins (from red, black and blue berries) are one of the most extensively researched polyphenols. The main obstacle however in their effective application is low bioavailability. PolyFount™ technology was designed to counteract this limitation and enhance bioavailability of polyphenols by use of proprietary technology of extraction, preparation of appropriate extract form and embedding of it into a food format of (among others) dark chocolate. Pharmacokinetic studies of bioavailability studies confirmed that PolyFount™ technology delivers significant resveratrol blood level after ingestion of a 10 g chocolate bar, and improves postprandial blood level of epicatechins 2.75 times in comparison to standard dark chocolate. In terms of bioactivity, 4 weeks daily consumption of 10 g piece of Rechoc results in 59% reduction of oxidative damage and 26 % reduction in LDL oxidation. This makes Rechoc in a form of a 10g chocolate bar an effective, tested and confirmed proposition of a daily source of beneficiary polyphenols : resveratrol and epicatechins.

Polyphenols

Polyphenols constitute one of the largest category of phytochemicals, most widely distributed among the plant kingdom, and an integral part of the human diet. These compounds are synthesized by plants as secondary metabolites and are usually synthesized as defense mechanisms against stressors such as pathogens [1]. Based on the number of phenolic rings as well as the structural moiety that holds these together, polyphenols are classified into four categories: phenolic acids, flavonoids, stilbenes and lignans, with the flavonoids further

classified into six subclasses (flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidins and flavanols) [2]. Classification of polyphenols is shown on the Figure 1

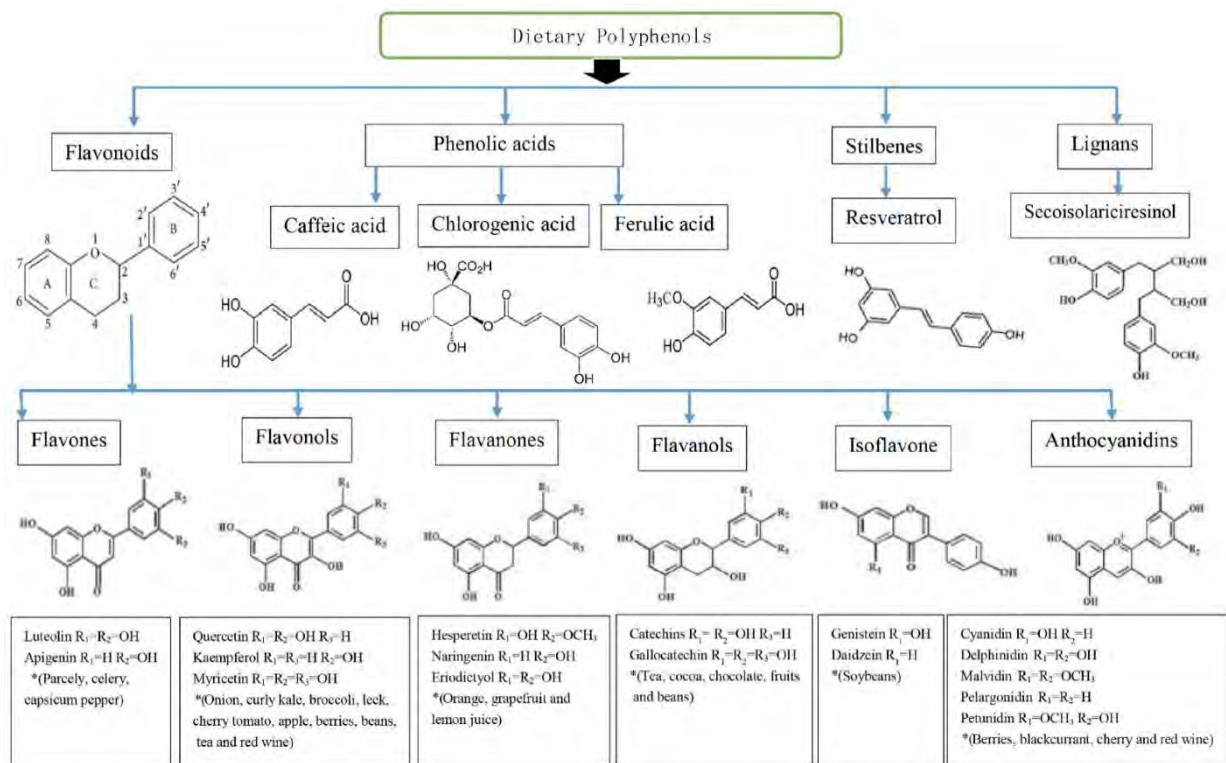


Figure 1. Dietary polyphenols classification

Source: *Nutrients* **2016** [5]

From over two decades, these compounds have been extensively researched for their capacity to improve human health. These analyses include a wide variety of clinical and nutritional epidemiological studies that indicate that populations whose diets are rich in polyphenols are less susceptible to cardiovascular diseases along with their complications and related mortality [3], [4]. There are reports of beneficial influence a of dietary polyphenols on diabetes [5]–[8], obesity [9]–[12], metabolic syndrome [13]–[15] and skin [16]–[20]. They also show antiviral and antimicrobial activities [21]–[23] and may even support proper children’s development [24]–[26] or reduce the risk of obesity in children [27]

Poor bioavailability is however a key issue for many substances particularly when administered orally [28]. Hence, whilst oral administration is the most convenient route it is one which use is often hampered by poor bioavailability. Typical polyphenols have oral bioavailability (mostly in animals) of 10% or less, and range of 2-20% is quite common [29].

Therefore, it is critical to find the way to increase their bioavailability, especially in a palatable food format.

From a variety of polyphenols being under research epicatechins (from cocoa or dark chocolate) and resveratrol (found i.a. in red wine) are substances that increasingly grab scientists' attention during last years.

Epicatechins

Cocoa (*Theobroma cacao* L., Sterculiaceae) is a widely consumed food ingredient. Although typically found in high-fat, high-sugar foods such as dark chocolate, cocoa is rich in polyphenols, methylxanthines, and monounsaturated fatty acids. There is increasing evidence that moderate consumption of cocoa and cocoa-containing foods may have beneficial effects on the health including vasodilatory, antioxidant, and anti-inflammatory effects [30]. The primary polyphenols present in cocoa are monomeric ((-)-epicatechin [EC] and (+)catechin) as well as oligomeric and polymeric (proanthocyanidin [PAC]) flavanols [30].

Interest in the effect of cocoa on cardiocascular diseases (CVD) began with observations among the Kuna Indian population in the San Blas Islands of Panama. This group had distinctively low rates of hypertension and CVD, coupled with an absence of the age-related increases in blood pressure (BP) observed in other populations [31], [32]. Environmental, rather than genetic, factors appeared to confer this protective role. This conclusion comes from the observation of population members who moved to the continental part of Panama. Changed dietary habits resulting in cessation of cacao infusion drinking resulted in increased CVD prevalence [31], [32]. Secondly, cocoa flavanols have been shown to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE) activity, and hence reduce blood pressure [33], [34]. Thirdly, there is evidence that suggest cocoa flavanols to have an indirect antioxidant effect within the cardiovascular system, upregulating NO-synthase activity and hence reducing blood pressure [35].

More recently, the study by Alkerwi et. al [36] examined the association of dark chocolate consumption with insulin resistance and serum liver enzymes in a national sample of adults in Luxembourg. The study reported an independent inverse relationship between daily dark chocolate consumption (100 g dose) and levels of serum insulin (reduction by 0.16 $\mu\text{g/l}$), HOMA-IR (reduction by 0.16) (homoeostasis model assessment of insulin resistance) and liver enzymes in adults (reduction by 0.10 mg/l), suggesting that dark chocolate consumption may

improve liver enzymes and protect against insulin resistance, a well-established risk factor for cardiometabolic disorders. The most common flavanol found in cocoa, epicatechin, is rapidly absorbed in humans and is detectable in blood plasma already 30 min after intake. The epicatechin levels peak 2–3 h after intake, exhibiting a strong positive correlation with the dose of ingested dark chocolate [37].

Similarly, comprehensive experimental evidence has demonstrated that cocoa-derived monomeric ((-)-epicatechin and (+)-catechin) and dimeric flavanols reduce NF- κ B activation thus resulting in reduced IL2 production and oxidative burst [38]. There is also consistent data on the protection of LDL particles against oxidation by cocoa flavanols [39].

The challenge remains that scientific data confirming beneficiary effects of cocoa epicatechins has been evidenced for high doses of cocoa solids (equivalent of minimum of 80-100 g of dark chocolate per day). Fresh cacao beans contain between 12 and 18% total flavanols [40], [41]. Common processing steps leading to production of cocoa and chocolate from cacao beans such as fermentation, roasting, alkaline treatment (Dutch processing), and baking in the presence of baking soda all have been shown to reduce both the level of total procyanidins and the level of low molecular weight flavanols [41]. The roasted beans, which subsequently are ground into chocolate liquor, natural cocoa powder, and Dutch-processed cocoa powder, are the main ingredients used for all chocolates, cocoa beverages, ice creams, and confections including cakes, biscuits, and cookies. During the process of cocoa and chocolate production the highest loss of epicatechin content takes place during the thermal processing (even 78% of epicatechin may be lost) and starts above the temperature of 60°C. Above this temperature epicatechins are epimerized to catechins. Dutch processing is another step which substantially decreases the level of epicatechins (up to 98%) due to strong alkalisation of the cocoa powder [42]

Studies have also been reported on other foods, particularly tea [43], [44], demonstrating a similar reduction in monomeric flavanols when exposed to high temperatures or increased pH.

These results show distinctly that cacao processing practically rules out the preventive daily use of epicatechins in a form of regular dark chocolate. New methods and processes of chocolate production and fortification are therefore needed to develop a real functional chocolate, which should additionally be confirmed in clinical studies of with reference to the bioavailability and bioefficacy of active polyphenols.

Resveratrol

Resveratrol is a polyphenolic phytochemical that is biosynthesized by certain edible plants such as grape, peanut or berry in response to phytochemical stress (microbiological, thermic, oxidative, mechanical or chemical). Chemically it is 3,5,4'-trihydroxystilbene, a stilbene derivative, which is a phenylpropanoid with a C6-C2-C6 general structural formula. It is found as two isomeric structures in nature, the *cis*- and *trans*-isoforms, the *trans*-isoform being convertible to *cis*-isoform by heating [45], [46]. Since it is biosynthesized to a greater extent in the lignified parts of these plants, the process of crushing and mashing grapes for the purpose of wine making results in relative enrichment of resveratrol in wine, making the latter a significant dietary source of resveratrol. The high resveratrol level in red wine was postulated as a factor in the "French Paradox", where epidemiological data revealed an apparent disconnect between French patterns of low rates of cardiovascular disease despite their high saturated fat consumption. Another application of resveratrol is related to ageing processes. Resveratrol activates the sirtuin family of enzymes, most notably the SIRT1 enzyme. SIRT1 is known to promote longevity (increase lifespan) in several lower animal species in the laboratory [47]–[50]. The activation of SIRT enzymes family results in the increase of mitochondrial activity, improvement of mitochondrial aerobic capacity, and promotion of oxidative phosphorylation [51]. SIRT proteins are also activated during low calorie diet (or SIRT diet, caloric restriction diet), which is proven to increase the lifespan, boosts metabolism and reduce cellular stress and inflammation [52], [53].

One other possible mechanism for the protective effects of resveratrol is the preservation of telomere length. Telomeres are repetitive nucleotide sequences located at the extreme ends of chromosomes and are considered to be indicators of biological age [54]. Thus, telomerase reactivation can prevent or delay the cellular aging process triggered by significant telomere shortening [55], [56]. There are reports, that resveratrol acts by upregulation of hTERT (telomerase reverse transcriptase) in normal cells and thus inducing telomerase activity in normal cells [54], [57] but reduces hTERT and telomerase activity in cancer cells [58].

Resveratrol action involves SIRT family proteins, which are proved to be activated by that compound [52] and are also a part of telomerase activation path [54], [59].

However, in the context of therapeutic engagement, resveratrol application and efficacy is limited by its hydrophobicity, which ameliorates bioavailability [60].

The absorption of resveratrol appears to be at least 70%, however in great contrast, the oral bioavailability of unchanged resveratrol is considerably less than 1% due to rapid and extensive metabolism, resulting in little unchanged resveratrol in the systemic circulation [61], [62]. Red wine has the highest content of well bioavailable trans-resveratrol because of the alcohol content [63][64], however it is also the alcohol content which limits its use as a daily source of this molecule.

Taking into consideration its overall multifaceted biological activity that ranges from anti-inflammatory to cardio-, neuro-, and nephro-protective effects and to anti-neoplastic attributes, a lot of innovative work has gone into the design and formulation of nano- and microemulsion-based formulation systems for resveratrol. These pharmaceutical formulation techniques enhance the bioavailability of this potential drug and prolong its duration of action [60]. However, so far no food product useful in prevention and nutraceutical supplementation has been developed with pharmacokinetic tests performed and bioavailability confirmed.

PolyFount™ technology

PolyFount™ technology was created to address the need to create the healthy, functional chocolate with health benefits of polyphenols. Used in Rechoc, PolyFount™ technology brings the fortification of the dark chocolate with two types of polyphenols: epicatechins, which are equivalent in profile to those of cocoa, and resveratrol, known mostly from its presence in red wine. The basis for the PolyFount™ technology is the proprietary method of polyphenol extraction from the berry fruits (e.g. aronia). The extract is standardized for the polyphenol content during every batch extraction. Additionally temperature of the extract processing was lowered in comparison to standard procedures to provide proper, standardized concentration of polyphenols (especially epicatechins, resveratrol and anthocyanins) in the extract as well as in the final product. Extract form of hydrogel is necessary due to chocolate matrix, as the standard powder would impact negatively the taste and texture of the chocolate. Using the hydrogel format does not alter the sensory sensations, viscosity, smoothness and melting parameters during dark chocolate consumption. That was one of the main goals in the preparation of Rechoc.

What is more important, method of chocolate fortification with the use of proprietary tempering process results in confirmed increase in postprandial blood levels of resveratrol, epicatechins and anthocyanins. Polyphenol blood levels were measured during pharmacokinetic tests – the only unquestionable way to confirm bioavailability of substances to the organism.

PolyFount™ technology advantages are based on the proprietary extraction method, usage of food format of dark chocolate and confirmed bioavailability enhancement of the bioactive substances unmatched by the standard dark chocolate which was measured and confirmed in pharmacokinetic and bioefficacy tests.

Rechoc clinical evidence

Bioefficacy tests – oxidative damage

For the purpose of the study there were recruited people whose blood was positive for the presence of oxidative and inflammatory damage markers. They were all Caucasians, from 43 to 68 years old, with no serious diseases or adverse conditions. All participants were randomised in groups of 8 people. During the trial they were asked not to change their diet and life-style routine.

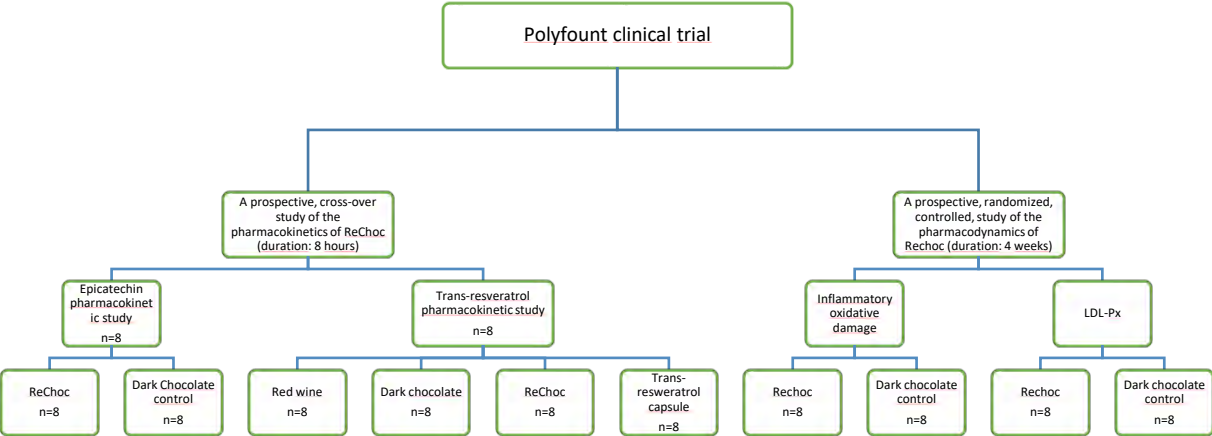
Each product was administered once a day and the trial lasted for 4 weeks

Acute pharmacokinetics and bioavailability of polyphenols

To assess the pharmacokinetics (PK) of *epicatechins/catechin* of Rechoc – dark chocolate with embedded aronia extracts, a crossover clinical study was performed. The number of volunteers was eight in each group of 35 to 66 years old, 4 men and 4 women. The volume of the piece of the ingested chocolate was 10g per person. The product was ingested with a half glass of warm water in the morning after 12 hours of fasting, and no any other food was taken for the duration of the each arm of the study

To assess the pharmacokinetics (PK) of trans-resveratrol a of dark chocolate, with embedded aronia extracts, again a crossover clinical study with the same group of volunteers was performed.

The diagram presenting the study design is presented below:



Test results

Bioavailability study

Unmodified trans-resveratrol bioavailability

PolyFount™ technology has been developed to protect trans-resveratrol from degrading factors of the human digestive system. This technology creates a chocolate where trans-resveratrol is protected and which helps to increase its bioavailability in an unmodified active form.

Results of bioavailability study are presented in the Figure 2

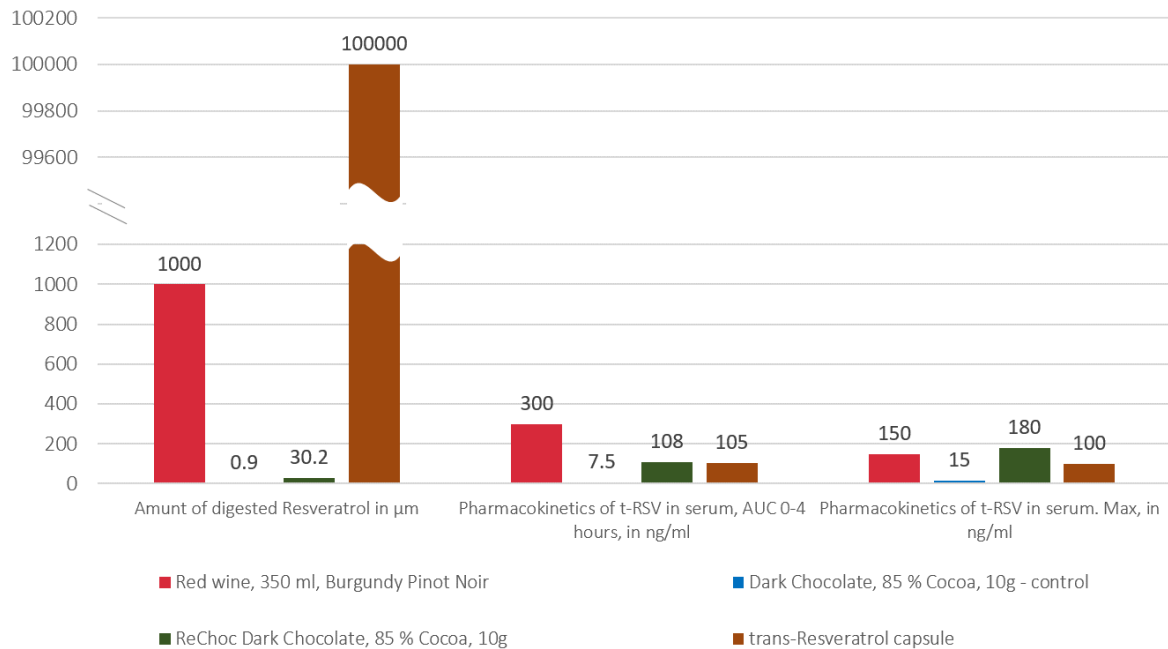


Figure 2. Rechoc resveratrol bioavailability crossover study

Based on: double-blind, randomized study, Lycotec, Cambridge, UK

The chart shows that 1 mg of trans-resveratrol consumed in the form of red wine resulted in the largest concentration of this molecule in the serum of the blood both in terms of the Area under the Curve (AUC) for the first 4 hours after ingesting, followed by Rechoc chocolate. The highest serum concentration of resveratrol was measured in the Rechoc group. Interestingly, a significantly lower level of resveratrol was detected in the resveratrol capsules group, despite a multi-fold higher dose. This only confirms the literature data of close-to-zero bioavailability of resveratrol in the form of crystal isolate.

The amount of resveratrol used in the form of aronia extract for the fortification process, which was added to the 10g piece of chocolate, was about 30µg. This, in combination with its intrinsic amount present in chocolate would result in the range of 30-35µg per ingested product. When trans resveratrol was ingested in 2000 times higher dose as a capsule but in a crystallised form its pharmacokinetic parameters were still below the values observed following the consumption of red wine

Rechoc provided the level of bioavailability of trans-resveratrol comparable with two glasses or half bottle of the red Burgundy. It is postulated that combination of polyphenols increase mutually bioavailability of each of them.

Epicatechins

Additional results were obtained of epicatechin pharmacokinetics after consumption of Rechoc in comparison to dark (50% cocoa) chocolate. In terms of the area under the curve, for epicatechin, concentration was 2.75 time higher for Rechoc than conventional dark chocolate (cocoa 50%) Results are presented below on Figure 3

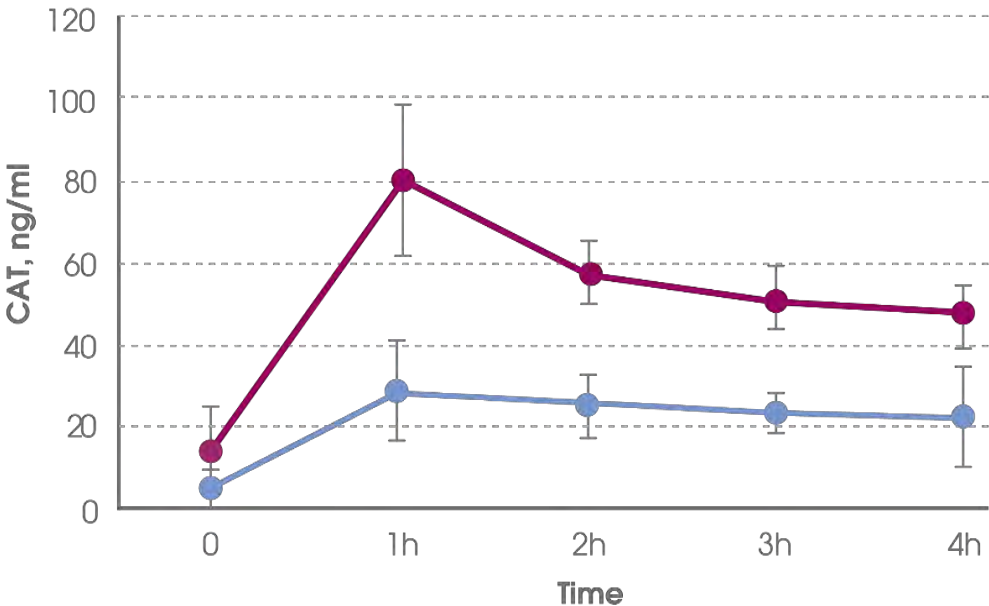


Figure 3. Rechoc epicatechin bioavailability crossover study

Red- Rechoc; Blue – dark chocolate; Rechoc both in terms of maximum concentration as well as AUC showed higher levels of epicatechin on blood of volunteers

Based on: double-blind, randomized study, Lycotec, Cambridge, UK

Efficacy study

Epicatechins and resveratrol have well reported antioxidant and anti-inflammatory properties. Therefore, the main objective of the study was to assess a possible effect of our products on the level of blood markers of oxidative and inflammatory damage

Inflammatory oxidative damage (Serum MDA μM)

The results of the malonyldialdehyde concentration measurements are shown on the Figure 4:

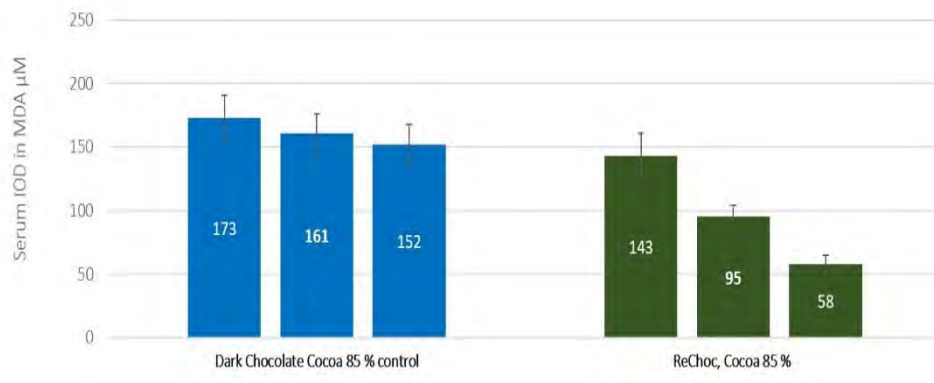


Figure 4. Inflammatory Oxidative Damage in MDA μM

Double-blind, randomized, placebo-controlled trial, Lycotec, CAMBRIDGE, UK

Data shows strong (4 times) reduction in oxidative stress level after four weeks of supplementation in comparison to dark chocolate without PolyFount™ fortification technology

LDL-Px

The other factor tested was the LDL-Px antibodies activity. As the oxidative stress has strong influence on the peroxidation of low density lipoproteins (LDL) and LDL oxidation is one of the major cause of the atherosclerosis onset and development [65]–[67], this parameter is crucial in determining the potential influence of Rechoc on cardiovascular system.

In that case a reduction in oxidation of LDL fraction of 26% was noticed (Figure 5). Dark chocolate showed no effect on this parameter.

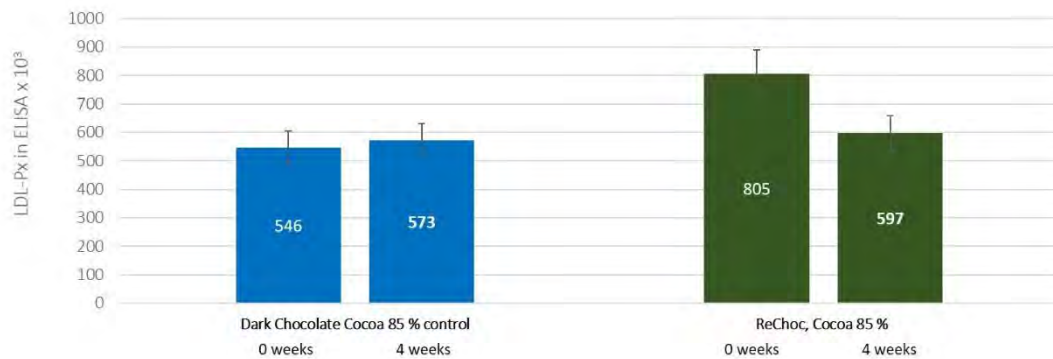


Figure 5. LDL oxidation reduction

Double-blind, randomized, placebo-controlled trial, Lycotec, CAMBRIDGE, UK

Conclusions

PolyFount™ technology was created to improve health benefits of dark chocolate by fortification with red wine equivalent resveratrol and epicatechins of the same profile as dark chocolate. Trial results performed in Lycotec (Cambridge, UK) showed that Rechoc Dark Chocolate, thanks to PolyFount™ technology used in the fortification process and production method, overcome the limitations of epicatechins and resveratrol bioavailability. Especially in case of resveratrol, despite much lower level of resveratrol in Rechoc (30.2 µg) in a single dose in comparison to 1000 µg in red wine, pharmacokinetic profile showed that both 0-4 hour profile as well as maximum concentration of this molecule in blood reached comparable levels. This proves the efficacy of used approach. Similarly, comparison of epicatechin bioavailability from Rechoc and dark chocolate showed almost 3 times higher concentration in Rechoc.

In addition to pharmacokinetic studies, which describe the concentration of the molecules in blood there were also performed the efficacy studies which showed that bioactives delivered to the systemic blood are also functional. Because of well-known antioxidative properties of both, epicatechins and resveratrol, two biomarkers were selected – inflammatory oxidative damage and lipoprotein peroxidation level. In both cases the embedded polyphenols

delivered by the use of PolyFount™ technology showed higher reduction rate of oxidative stress (59% rechoc vs 12% dark chocolate) and LDL oxidation (26% in case of Rechoc; dark chocolate showed no reduction)

These data prove that PolyFount™ technology may be successfully used to improve polyphenol bioavailability. Therefore Rechoc can be recommended as a daily source of beneficiary, bioavailable and bioactive polyphenols as a part of a healthy diet.

- [1] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, 'Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease', *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009.
- [2] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, 'Polyphenols: Food sources and bioavailability', *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, no. 5. pp. 727–747, 2004.
- [3] I. C. Arts and P. C. Hollman, 'Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies.', *The American journal of clinical nutrition*, vol. 81, no. 1 Suppl. 2005.
- [4] S. Renaud and M. de Lorgeril, 'Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease', *Lancet*, vol. 339, no. 8808, pp. 1523–1526, 1992.
- [5] Y. Kim, J. B. Keogh, and P. M. Clifton, 'Polyphenols and Glycemic Control.', *Nutrients*, vol. 8, no. 1, p. E17, 2016.
- [6] T. Szkudelski and K. Szkudelska, 'Resveratrol and diabetes: from animal to human studies.', *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1852, no. 6, pp. 1145–54, Jun. 2015.
- [7] J. K. Schluesener and H. Schluesener, 'Plant polyphenols in the treatment of age-associated diseases: Revealing the pleiotropic effects of icariin by network analysis', *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 58, no. 1. pp. 49–60, 2014.
- [8] F. Wu, Z. Jin, and J. Jin, 'Hypoglycemic effects of glabridin, a polyphenolic flavonoid from licorice, in an animal model of diabetes mellitus', *Mol. Med. Rep.*, vol. 7, no. 4, pp. 1278–1282, 2013.
- [9] S. Wang, N. Moustaid-Moussa, L. Chen, H. Mo, A. Shastri, R. Su, P. Bapat, I. S. Kwun, and C. L. Shen, 'Novel insights of dietary polyphenols and obesity', *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 25, no. 1. pp. 1–18, 2014.
- [10] Y. Xu, M. Zhang, T. Wu, S. Dai, J. Xu, and Z. Zhou, 'The anti-obesity effect of green tea polysaccharides, polyphenols and caffeine in rats fed with a high-fat diet', *Food Funct.*, vol. 6, no. 1, pp. 296–303, 2015.
- [11] J. Huang, Y. Wang, Z. Xie, Y. Zhou, Y. Zhang, and X. Wan, 'The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies', *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 68, no. 10, pp. 1075–1087, 2014.
- [12] G. Farhat, S. Drummond, L. Fyfe, and E. A. S. Al-Dujaili, 'Dark chocolate: An obesity paradox or a culprit for weight gain?', *Phytotherapy Research*, vol. 28, no. 6. pp. 791–797, 2014.
- [13] D. E. Roopchand, R. N. Carmody, P. Kuhn, K. Moskal, P. Rojas-Silva, P. J. Turnbaugh, and I. Raskin, 'Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome', *Diabetes*, vol. 64, no. 8, pp. 2847–2858, 2015.
- [14] Y. P. Wang, E. Wat, C. M. Koon, C. W. Wong, D. W. S. Cheung, P. C. Leung, Q. S. Zhao, K. P. Fung, and C. B. S. Lau, 'The beneficial potential of polyphenol-enriched fraction from *Erigerontis Herba* on metabolic syndrome', *J. Ethnopharmacol.*, vol. 187, pp. 94–103, 2016.
- [15] I. Moreno-Indias, L. Sánchez-Alcoholado, P. Pérez-Martínez, C. Andrés-Lacueva, F. Cardona, F. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuño, 'Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients', *Food Funct.*, vol. 7, no. 4, pp. 1775–1787, 2016.

- [16] S. Basu-Modak, M. J. Gordon, L. H. Dobson, J. P. E. Spencer, C. Rice-Evans, and R. M. Tyrrell, 'Epicatechin and its methylated metabolite attenuate UVA-induced oxidative damage to human skin fibroblasts.', *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 35, no. 8, pp. 910–21, Oct. 2003.
- [17] J.-E. Kim, D. Song, J. Kim, J. Choi, J. R. Kim, H.-S. Yoon, J.-S. Bae, M. Han, S. Lee, J. S. Hong, D. Song, S.-J. Kim, M.-J. Son, S.-W. Choi, J. H. Chung, T.-A. Kim, and K. W. Lee, 'Oral supplementation with cocoa extract reduces UVB-induced wrinkles in hairless mouse skin.', *J. Invest. Dermatol.*, Feb. 2016.
- [18] K. Neukam, W. Stahl, H. Tronnier, H. Sies, and U. Heinrich, 'Consumption of flavanol-rich cocoa acutely increases microcirculation in human skin', *Eur. J. Nutr.*, vol. 46, no. 1, pp. 53–56, 2007.
- [19] A. Ratz-Yko, J. Arct, S. Majewski, and K. Pytkowska, 'Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin', *Phyther. Res.*, vol. 29, no. 4, pp. 509–517, 2015.
- [20] P. Gasser, E. Lati, L. Peno-Mazzarino, D. Bouzoud, L. Allegaert, and H. Bernaert, 'Cocoa polyphenols and their influence on parameters involved in ex vivo skin restructuring.', *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 30, no. 5, pp. 339–45, Oct. 2008.
- [21] M. Catel-Ferreira, H. Tnani, C. Hellio, P. Cosette, and L. Lebrun, 'Antiviral effects of polyphenols: Development of bio-based cleaning wipes and filters', *J. Virol. Methods*, vol. 212, pp. 1–7, 2015.
- [22] Z.-F. Yang, L.-P. Bai, W. Huang, X.-Z. Li, S.-S. Zhao, N.-S. Zhong, and Z.-H. Jiang, 'Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure–activity relationship analysis', *Fitoterapia*, vol. 93, pp. 47–53, 2014.
- [23] M. Daglia, 'Polyphenols as antimicrobial agents', *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2, pp. 174–181, 2012.
- [24] Y. Wu, J. Wang, W. Cai, and X. Shen, 'Could tea polyphenols be beneficial for preventing the precocious puberty?', *Med. Hypotheses*, vol. 95, pp. 24–26, 2016.
- [25] Z. Chovanová, J. Muchová, M. Sivonová, M. Dvoráková, I. Zitnanová, I. Waczulíková, J. Trebatická, I. Skodáček, and Z. Duracková, 'Effect of polyphenolic extract, Pycnogenol, on the level of 8-oxoguanine in children suffering from attention deficit/hyperactivity disorder.', *Free Radic. Res.*, vol. 40, no. 9, pp. 1003–10, 2006.
- [26] Fajriani, A. Mustamin, and Asmawati, 'The role of cacao extract in reduction of the number of mutans streptococci colonies in the saliva of 12-14 year-old-children', *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.*, vol. 34, no. 2, p. 120, 2016.
- [27] T. Matsuyama, Y. Tanaka, I. Kamimaki, T. Nagao, and I. Tokimitsu, 'Catechin Safely Improved Higher Levels of Fatness, Blood Pressure, and Cholesterol in Children', *Obesity*, vol. 16, no. 6, pp. 1338–1348, 2008.
- [28] R. J. Wood, 'BIOAVAILABILITY', in *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2005, pp. 195–201.
- [29] M. Hu, 'Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms.', *Mol. Pharm.*, vol. 4, no. 6, pp. 803–6, Dec. 2007.
- [30] Y. Gu and J. D. Lambert, 'Modulation of metabolic syndrome-related inflammation by cocoa', *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 57, pp. 948–961, 2013.
- [31] M. L. McCullough, K. Chevaux, L. Jackson, M. Preston, G. Martinez, H. H. Schmitz, C. Coletti, H. Campos, and N. K. Hollenberg, 'Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols.', *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 47 Suppl 2, pp. S103-NaN-121, 2006.
- [32] L. S. Latham, Z. K. Hensen, and D. S. Minor, 'Chocolate-Guilty Pleasure or Healthy Supplement?', *J. Clin. Hypertens.*, vol. 16, pp. 101–106, 2014.
- [33] I. A. L. Persson, K. Persson, S. Hägg, and R. G. G. Andersson, 'Effects of cocoa extract and dark chocolate on angiotensin-converting enzyme and nitric oxide in human endothelial cells and healthy volunteers--a nutrigenomics perspective.', *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 57, pp. 44–50, 2011.
- [34] L. Actis-Goretta, J. I. Ottaviani, and C. G. Fraga, 'Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich

- foods', *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pp. 229–234, 2006.
- [35] C. L. Keen, R. R. Holt, P. I. Oteiza, C. G. Fraga, and H. H. Schmitz, 'Cocoa antioxidants and cardiovascular health.', *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 1 Suppl, p. 298S–303S, Jan. 2005.
- [36] A. Alkerwi, N. Sauvageot, G. E. Crichton, M. F. Elias, and S. Stranges, 'Daily chocolate consumption is inversely associated with insulin resistance and liver enzymes in the Observation of Cardiovascular Risk Factors in Luxembourg study.', *Br. J. Nutr.*, pp. 1–8, Mar. 2016.
- [37] M. Richelle, I. Tavazzi, M. Enslin, and E. A. Offord, 'Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate.', *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 53, pp. 22–26, 1999.
- [38] G. G. Mackenzie and P. I. Oteiza, 'Modulation of transcription factor NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cell lines: effect of (-)-epicatechin.', *Free Radic. Res.*, vol. 40, pp. 1086–1094, 2006.
- [39] A. L. Waterhouse, J. R. Shirley, and J. L. Donovan, 'Antioxidants in chocolate.', *Lancet*, vol. 348, p. 834, 1996.
- [40] H. KIM and P. G. KEENEY, '(-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans', *J. Food Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 1090–1092, 1984.
- [41] W. J. Hurst, S. H. Krake, S. C. Bergmeier, M. J. Payne, K. B. Miller, and D. A. Stuart, 'Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients', *Chem. Cent. J.*, vol. 5, no. 1, p. 53, Sep. 2011.
- [42] M. J. Payne, W. J. Hurst, K. B. Miller, C. Rank, and D. A. Stuart, 'Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients', *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 19, pp. 10518–10527, 2010.
- [43] Z. Y. Chen, Q. Y. Zhu, D. Tsang, and Y. Huang, 'Degradation of green tea catechins in tea drinks', *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 1, pp. 477–482, 2001.
- [44] R. Wang, W. Zhou, and R. H. Wen, 'Kinetic Study of the Thermal Stability of Tea Catechins in Aqueous Systems Using a Microwave Reactor', *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 16, pp. 5924–5932, 2006.
- [45] A. R. Neves, M. Lucio, J. L.C. Lima, and S. Reis, 'Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions', *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 11, pp. 1663–1681, Mar. 2012.
- [46] V. Cucciolla, A. Borriello, A. Oliva, P. Galletti, V. Zappia, and F. Della Ragione, 'Resveratrol: From Basic Science to the Clinic', *Cell Cycle*, vol. 6, no. 20, pp. 2495–2510, Oct. 2007.
- [47] J. S. Allard, E. Perez, S. Zou, and R. de Cabo, 'Dietary activators of Sirt1', *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 299, no. 1, pp. 58–63, 2009.
- [48] K. T. Howitz, K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, D. W. Lamming, S. Lavu, J. G. Wood, R. E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L.-L. Zhang, B. Scherer, and D. A. Sinclair, 'Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan.', *Nature*, vol. 425, no. 6954, pp. 191–196, 2003.
- [49] J. G. Wood, B. Rogina, S. Lavu, K. Howitz, S. L. Helfand, M. Tatar, and D. Sinclair, 'corrigendum: Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans', *Nature*, vol. 431, no. 7004, pp. 107–107, Sep. 2004.
- [50] M. Viswanathan, S. K. Kim, A. Berdichevsky, and L. Guarente, 'A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span', *Dev. Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 605–615, 2005.
- [51] J. T. Rodgers, C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman, and P. Puigserver, 'Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1', *Nature*, vol. 434, no. 7029, pp. 113–118, Mar. 2005.
- [52] E. van der Veer, Z. Nong, C. O'Neil, B. Urquhart, D. Freeman, and J. G. Pickering, 'Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation.', *Circ. Res.*, vol. 97, no. 1, pp. 25–34, 2005.

- [53] L. Guarente, 'Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome.', *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 868–874, 2006.
- [54] P. Huang, S. M. Riordan, D. P. Heruth, D. N. Grigoryev, L. Q. Zhang, and S. Q. Ye, 'A critical role of nicotinamide phosphoribosyltransferase in human telomerase reverse transcriptase induction by resveratrol in aortic smooth muscle cells.', *Oncotarget*, vol. 6, no. 13, pp. 10812–24, 2015.
- [55] F. Sahin, C. B. Avci, C. Gunduz, C. Sezgin, I. Y. Simsir, and G. Saydam, 'Gossypol exerts its cytotoxic effect on HL-60 leukemic cell line via decreasing activity of protein phosphatase 2A and interacting with human telomerase reverse transcriptase activity.', *Hematology*, vol. 15, no. 3, pp. 144–50, 2010.
- [56] F. Fyhrquist, O. Saijonmaa, and T. Strandberg, 'The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease.', *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 10, no. 5, pp. 274–83, 2013.
- [57] X. Bin Wang, L. Zhu, J. Huang, Y. G. Yin, X. Q. Kong, Q. F. Rong, A. W. Shi, and K. J. Cao, 'Resveratrol-induced augmentation of telomerase activity delays senescence of endothelial progenitor cells', *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 124, no. 24, pp. 4310–4315, 2011.
- [58] G. Lanzilli, M. P. Fuggetta, M. Tricarico, A. Cottarelli, A. Serafino, R. Falchetti, G. Ravagnan, M. Turriziani, R. Adamo, O. Franzese, and E. Bonmassar, 'Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro.', *Int. J. Oncol.*, vol. 28, no. 3, pp. 641–8, 2006.
- [59] H. Yang, T. Yang, J. a. Baur, E. Perez, T. Matsui, J. J. Carmona, D. W. Lamming, N. C. Souza-Pinto, V. a. Bohr, A. Rosenzweig, R. de Cabo, A. A. Sauve, and D. a. Sinclair, 'Nutrient-Sensitive Mitochondrial NAD⁺ Levels Dictate Cell Survival', *Cell*, vol. 130, no. 6, pp. 1095–1107, 2007.
- [60] A. Malhotra, S. Bath, and F. Elbarbry, 'An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol.', *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2015, p. 803971, Jan. 2015.
- [61] T. Walle, F. Hsieh, M. H. DeLegge, J. E. Oatis, and U. K. Walle, 'High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans', *Drug Metab. Dispos.*, vol. 32, no. 12, pp. 1377–1382, 2004.
- [62] T. Walle, 'Bioavailability of resveratrol.', *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1215, pp. 9–15, Jan. 2011.
- [63] J. Burns, T. Yokota, H. Ashihara, M. E. J. Lean, and A. Crozier, 'Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol', pp. 3337–3340, 2002.
- [64] M. Rotches-Ribalta, C. Andres-Lacueva, R. Estruch, E. Escribano, and M. Urpi-Sarda, 'Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets', *Pharmacol. Res.*, vol. 66, no. 5, pp. 375–382, 2012.
- [65] A. Lapointe, C. Couillard, and S. Lemieux, 'Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles', *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, pp. 645–658, 2006.
- [66] S. Lee, K. G. Birukov, C. E. Romanoski, J. R. Springstead, A. J. Lusis, and J. A. Berliner, 'Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis', *Circulation Research*, vol. 111, pp. 778–799, 2012.
- [67] J. R. Ward, H. L. Wilson, S. E. Francis, D. C. Crossman, and I. Sabroe, 'Translational mini-review series on immunology of vascular disease: Inflammation, infections and Toll-like receptors in cardiovascular disease', *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 156, pp. 386–394, 2009.



POLYFOUNT™

BIOAVAILABLE POLYPHENOL FORTIFICATION



Use of Polyfount technology in chocolate spreads – the evaluation trial with the use of market available hazelnut chocolate spread.

1. POLYFOUNT TECHNOLOGY – BREAKING THE LIMITATIONS OF POLYPHENOLS BIOAVAILABILITY

Polyfount technology enables any chocolate, cocoa, cacao butter or other food oils based confectionary products become a meaningful and effective delivery format of various fruits and cocoa polyphenols. Polyfount technology has been validated on solid dark and milk chocolate, with confirmed effect of providing significant bioavailability of epicatechins, anthocyanins and resveratrol.

Now Cambridge Chocolate Technologies team has performed laboratory formulation tests and clinical studies to prove and confirm that Polyfount technology can be used to fortify market available chocolate spreads and fudges making these confectionary formats an interesting proposition in the rapidly growing market of healthy confectionary products, as well and children products. What is critical – the Polyfount technology does not alter the taste nor texture of the existing products and is cheap enough to allow them to be mass market affordable. Also the supply chain – fruit derived liquor that is tempered in chocolates or incorporates in any other food matrixes - is safely secured, scalable and sustainable in the future.

Our intention is to create products that will be desired and demanded because of their irreplaceable taste, but at the same time will offer certain health benefits of Polyphenols, which are becoming widely recognized by dietitians, scientists and consumers through the awareness of health benefits of fruit and vegetable diets. Consumers are also increasingly aware of the health benefits of cacao, cocoa, dark chocolate, berry fruits or red wine. Now all those benefits can be delivered in a chocolate format, which has been confirmed in bioavailability trials in human studies.

This data is meaningful, as the biggest limitation of widespread use of polyphenols in daily healthy supplementation is their bioavailability, which defines the level in blood of a given food ingredient after its ingestion. Polyphenol extracts are not effective and even natural formats of

fruits and vegetables show only 5-15 % bioavailability of unmodified polyphenols in blood. This is caused by low absorption and rapid liver deactivation of polyphenols from our diet. Polyfound technology based products help overcome these limitations. They offer polyphenols protection for up to 7 hours, at the unmatched level with any other chocolate, spreads or candy format.

This report show the bioavailability data and also offers quick summary of 3 polyphenols we have focused on in our development works: epicatechins, resveratrol and anthocyanins. Massive and still increasing scientific research has been done to evidence health related benefits of polyphenol rich diet. Now these benefits are available in delicious formats of chocolate, chocolate spreads and fudges, which additionally have clinically proven bioavailability.

2. POLYPHENOLS – SCIENTIFIC EVIDENCE IS MOUNTING

Epicatechin

Cocoa (from *Theobroma cacao* L., Sterculiaceae) is a widely consumed food ingredient. Although typically found in high-fat, high-sugar foods such as dark chocolate, cocoa is rich in polyphenols, methylxanthines, and monounsaturated fatty acids. There is increasing evidence that moderate consumption of cocoa and cocoa-containing foods may have beneficial effects on the health including vasodilatory, antioxidant, and anti-inflammatory effects [1]. Interest in the effect of cocoa on cardiocascular diseases (CVD) began with observations among the Kuna Indian population in the San Blas Islands of Panama. This group had distinctively low rates of hypertension and CVD, coupled with an absence of the age-related increases in blood pressure (BP) observed in other populations [2], [3]. Comparative observations of tribe members who stayed on the islands with the ones that migrated to the continent showed that the change of their diet resulting in cessation of cocoa infusion drinking led to increased CVD prevalence [2], [3].

Catechin rich beverages were also investigated as the factors preventing fat accumulation and cardiovascular risk among obese children [4]. Childhood obesity is an increasing problem which affects only in the USA 17%, that is about 12.7 million, children and adolescents [5].

According to World Health Organization (WHO) obese children are more likely to develop a variety of health problems as adults which include cardiovascular disease, insulin resistance (often an early sign of impending diabetes), musculoskeletal disorders (especially osteoarthritis - a highly disabling degenerative disease of the joints), some cancers (endometrial, breast and colon) and disability [6]. According to Matsuyama and colleagues [4] at least to some extent these risks may be attenuated by catechins. After 24-week daily ingestion of catechin rich beverage improved blood cholesterol levels in obese and near-obese children was observed. To make it more interesting, improvement in BMI, waist circumference, body fat mass, LDL-cholesterol, glucose, systolic blood pressure and LDL/HDL cholesterol ratio was noticed without raising any safety concerns.

Additionally catechin polyphenols were proven in the study of Yoon et. al [8] to reduce acne by modulation of several key pathological factors of acne, including hyper-seborrhea, inflammation, and *P. acnes* overgrowth both in cell culture and during the 8-week randomized, split-face, clinical trial. Another trial by Goyal et. al [9] showed that catechin containing mouth wash was efficient in reduction of *S. mutans* count in plaque as well as in saliva for after 1- and 2-week intervals from baseline and even more efficient than chlorhexidine (CHX).

The major limitation of turning above trials into meaningful dietary interventions or actual products was the format in which the study subjects were given epicatechins. This format was either a cocoa drink of very high quantity of cacao solids, or large amount (50-70 g) of dark chocolate. Cacao drink is a very expensive proposition, and such a large dose of dark chocolate is difficult in daily routine preventive intake due to its calories level (300-450 calories) and dark chocolate taste, which is not appreciated by big majority of children.

Resveratrol

Resveratrol is a polyphenolic phytochemical that is biosynthesized by certain edible plants such as grape, peanut or berry in response to phytogetic stress (microbiological, thermic, oxidative, mechanical or chemical). The high resveratrol level in red wine was postulated as a factor in the “French Paradox”, where epidemiological data revealed an apparent disconnect between French patterns of low rates of cardiovascular disease and lean posture despite their high saturated fat consumption. Resveratrol activates the sirtuin family of enzymes, most

notably the SIRT1 enzyme. SIRT1 is known to promote longevity (increase lifespan) [10]–[13]. The activation of SIRT enzymes family results in the increase of mitochondrial activity, improvement of mitochondrial aerobic capacity, and promotion of oxidative phosphorylation [14]. The absorption of resveratrol appears to be at least 70%, however in great contrast, the oral bioavailability of unchanged resveratrol is considerably less than 1% due to rapid and extensive metabolism, resulting in little unchanged resveratrol in the systemic circulation [15], [16]. Red wine has the highest content of well bioavailable trans-resveratrol because of the alcohol content [17][18], however it is also the alcohol content which limits its use as a daily source of this molecule, especially among children.

Resveratrol, similarly to epicatechins, is proven to counteract or prevent obesity in several different mechanisms. First, it has a role in reducing the expression of genes involved in adipogenesis and maturation of adipocytes (PPAR, C / EBP, SREBP-1c, FAS, HSL, LPL), thereby reducing adipose tissue [19]. Second, resveratrol reduces the rate of lipogenesis, decreases lipid accumulation in adipose tissue, and facilitates apoptosis of adipocytes [19], [20]. Finally, by activating proteins from the SIRT family, it allows for increased mitochondrial biogenesis, increases their activity, and increases the oxidation of fatty acids for energy purposes [21], [22].

It was also shown by Miraglia et. al [23] that resveratrol in combination with carboxymethyl- β -glucan reduces the pollen caused allergy symptoms. The double-blinded, placebo-controlled and randomized study provided *in vivo* evidence that resveratrol combined with carboxymethyl-b-glucan was capable of significantly affecting nasal symptoms and antihistaminic consumption in children with allergic rhinitis due to Parietaria pollen. Authors state that resveratrol was capable of reducing eosinophil infiltration with potency similar to that of dexamethasone. Again, all above mentioned properties of Resveratrol are not really available for common use due to its marginal bioavailability in any food or supplementation format except for red wine. Polyfount technology ensures that 10 g of Polyfount chocolate offers resveratrol blood bioavailability equal to 2 glasses of red wine. Now we have shown that also chocolate spreads can become a source of this potent polyphenol.

Anthocyanins

Anthocyanins are a natural red-purple pigments occurring in plants. These water-soluble vacuolar chemical substances stand behind the colors of a variety of flowers and fruits. Their color depends on the pH of the environment and the chelation of metal ions [24], [25]. Anthocyanins are glycosides of the the aglicone skeleton of the anthocyanidins (C6-C3-C6). Anthocyanidins can be conjugated with glucose, galactose, rhamnose or arabinose forming a O-glycosidic bond with a hydroxyl group at C-3 (3-O-glycosides). At this moment, several hundred different varieties of anthocyanins have been identified. These compounds have different modifications of chemical structure [26]. In comparison to other flavonoids, the bioavailability of anthocyanins is relatively low. It primarily depends on the food matrix and interactions of these active ingredients with other food components [27]. Regular supplementation of anthocyanin has been shown to reduce the incidence of diabetes and other metabolic disorders [28]. Diet rich in anthocyanins reduce body fat accumulation induced by high-fat diet (60% energy from fat) [29]. Similar conclusion are set after addition of the extract from blueberries to high-fat meals (45% energy from fat) in mice [30]. Anthocyanin rich diet reduced also the inflammation and improved lipid profile among dyslipidaemic children and adolescents [31]. They has also been described to positively the insulin sensitivity in human adipocytes [32], [33]. A diet rich in anthocyanins reduces the risk of heart attacks and other cardiovascular diseases [34]. Anthocyanins occurring in the blueberries protect also against cardiovascular disease [35]. Positive effect in cardiovascular diseases can be attributed by anti-inflammation and antiplatelet activity of anthocyanins [36], [37].

There are also reports on immunomodulatory effects of anthocyanins. Park et. al [38] describe their role in asthma - a common chronic inflammatory disease regulated by coordination of T-helper cell type 2 (Th2) cytokines and inflammatory signal molecules. The intake of anthocyanins effectively suppressed allergic inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR) in a model of asthma. Moreover it was shown in the study that these effects of anthocyanins were related to decrease of Th2 and pro-inflammatory cytokines, and hence authors concluded that anthocyanins can be suitable candidates for a dietary supplement to attenuate the initial development as well as the symptoms of asthma.

Investigation of the antimicrobial properties of anthocyanin extracts showed inhibitory effects on the growth of Gram-positive (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

subtilis and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative strains (*Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium).[39].

In addition to their antimicrobial properties anthocyanins were also described to have the antiviral functions. Delphinidin, a polyphenol belonging to the anthocyanidin family, was shown to act as inhibitor of HCV entry, by acting directly on the viral particle and impairing its attachment to the cell surface [40]. Similar action of anthocyanins was also shown for food-borne viruses as Noroviruses, hepatitis A virus and Rotaviruses [41] or against influenza viruses A and B [42]. This confirms traditional usage of elderberry (*Sambucus nigra* L.) extracts for treating influenza and colds. This extract shows a beneficial effect through the stimulation of immune response and prevention of the viral infection and reducing virus count. Studies on anti-influeza activity of anthocyanin rich *Sambucus* extract have found the inhibition of both haemagglutination [43] (4) and viral proliferation [44] as well as prevention of the adhesion of the virus to the host receptors [45]. In addition elderberry extract based product (Sambucol) was reported to stimulate the immune system by enhancing the production of cytokines by monocytes [46]. That means that in addition to its antiviral properties, Sambucol Elderberry Extract and its formulations activate the healthy immune system by increasing inflammatory cytokine production. Sambucol might therefore be beneficial to the immune system activation and in the inflammatory process in healthy individuals or in patients with various diseases [46]. Authors conclude also that this formulation containing elderberry anthocyanins, could also have an immunoprotective or immunostimulatory effect when administered to cancer or AIDS patients, in conjunction with chemotherapeutic or other treatments.

No confectionary format functional food with confirmed bioavailability of anthocyanins has been created until now. We strongly believe daily consumption of Polyfount based products can contribute to maintaining good health and modulating the immune system to help with daily challenges in both adults and children.

Results

Cross-over study was performed on 8 healthy volunteers (4 women and 4 men) aged 35-64 years. The following parameters were measured during 4 hours after ingestion of the control and Polyfount spread: blood glucose concentration, as well as epicatechin, resveratrol and anthocyanins concentration in blood.

The results show that tested polyphenols are bioavailable after just 15 g portion of fortified market available chocolate spread. Polyfount fortification adds polyphenol benefits to confectionary products without deteriorating their palatability, texture and cost. Polyfount should be applied whenever possible in confectionary products as they can become significant daily source of valuable, bioavailable nutrients.

On top of the above – Polyfount improves the postprandial glucose profile, which is of higher and higher concern among more savvy consumers.

Blood glucose concentration increment

Polyphenols which apart from other beneficial properties, may interfere with glucose absorption in the intestine, support insulin function and facilitate a more efficient utilisation of consumed glucose resulting in more beneficial postprandial glucose profile. Therefore blood glucose level was measured. Area under the curve increment glucose reduction in comparison to control sample was 14%.

Blood glucose concentration increment is shown on Figure 1. The tests were performed using a Biosystem A25 automated analyzer (Applied Biosystems, Grand Island, NY) using BioSys kits and calibrators.

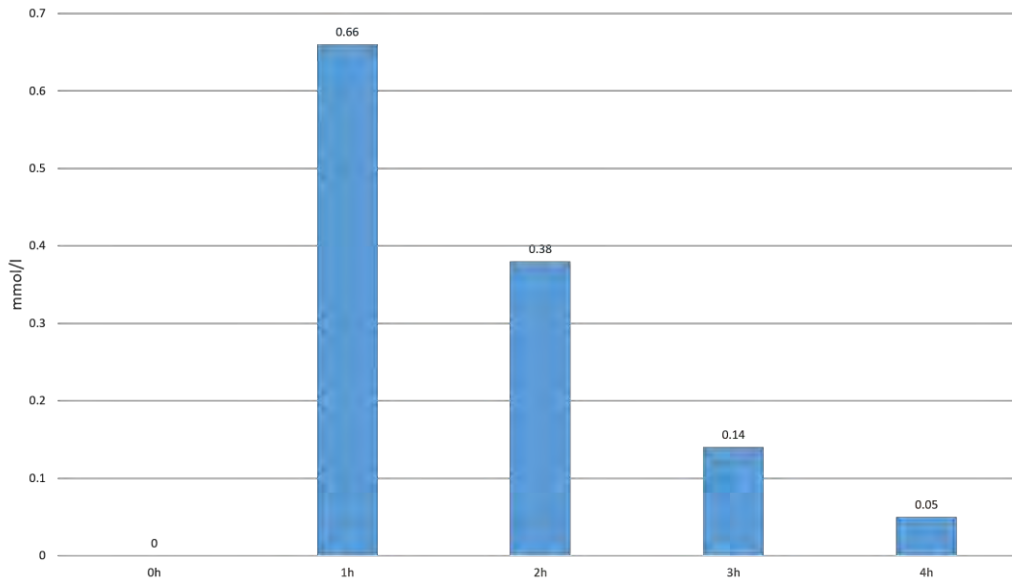


Figure 1. Blood glucose concentration increment

Crossover study on 8 clinically healthy volunteers (4 male and 4 females), 25-65 years old. Lycotec, Cambridge, UK

Epicatechin bioavailability

Epicatechin blood concentration was measured using Acquity UPLC with triple quadrupole mass spectrometer (Waters, USA). Results after ingestion of Polyfount spread are presented on the Figure 2

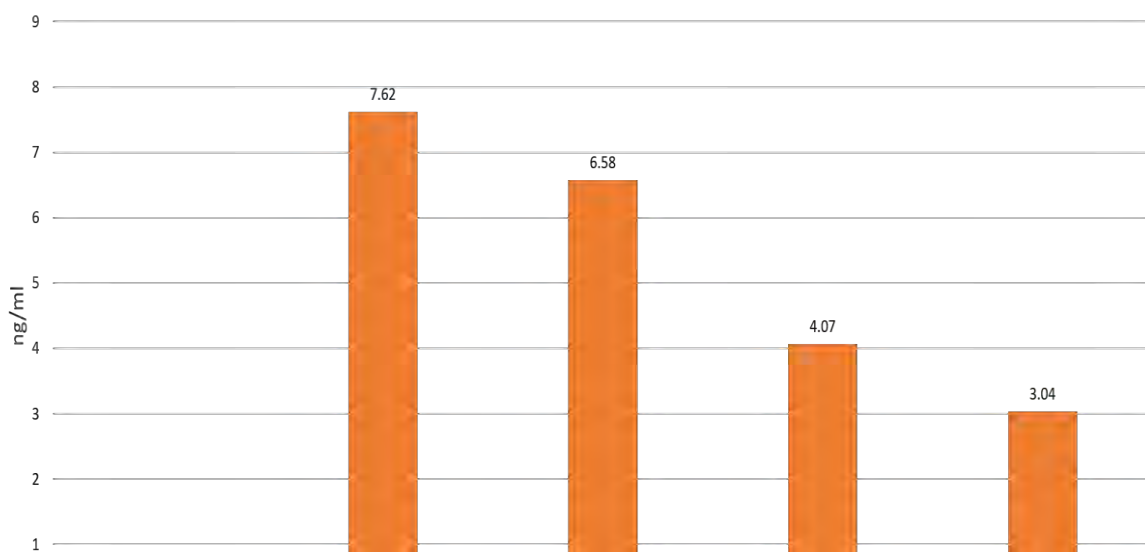


Figure 2. Blood epicatechin concentration

Crossover study on 8 clinically healthy volunteers (4 male and 4 females), 25-65 years old. Lycotec, Cambridge, UK

Trans-resveratrol bioavailability

Trans-resveratrol blood concentration was measured using specific antibodies against this molecule. Results are presented on Figure 3

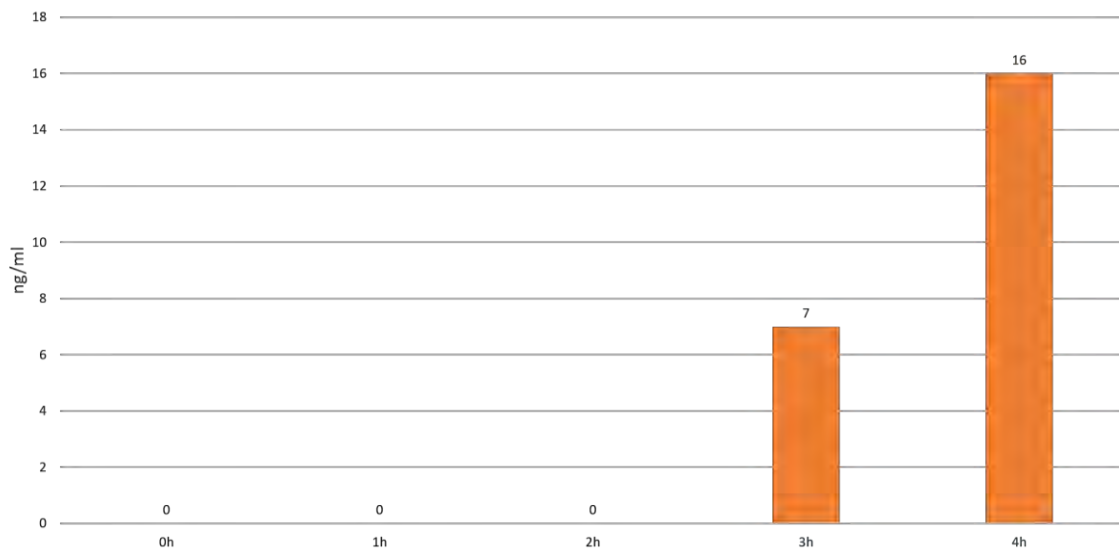


Figure 3. Blood trans-resveratrol concentration

Crossover study on 8 clinically healthy volunteers (4 male and 4 females), 25-65 years old. Lycotec, Cambridge, UK

Anthocyanin bioavailability

Blood anthocyanin concentration was measured using Acquity UPLC with triple quadrupole mass spectrometer (Waters, USA).

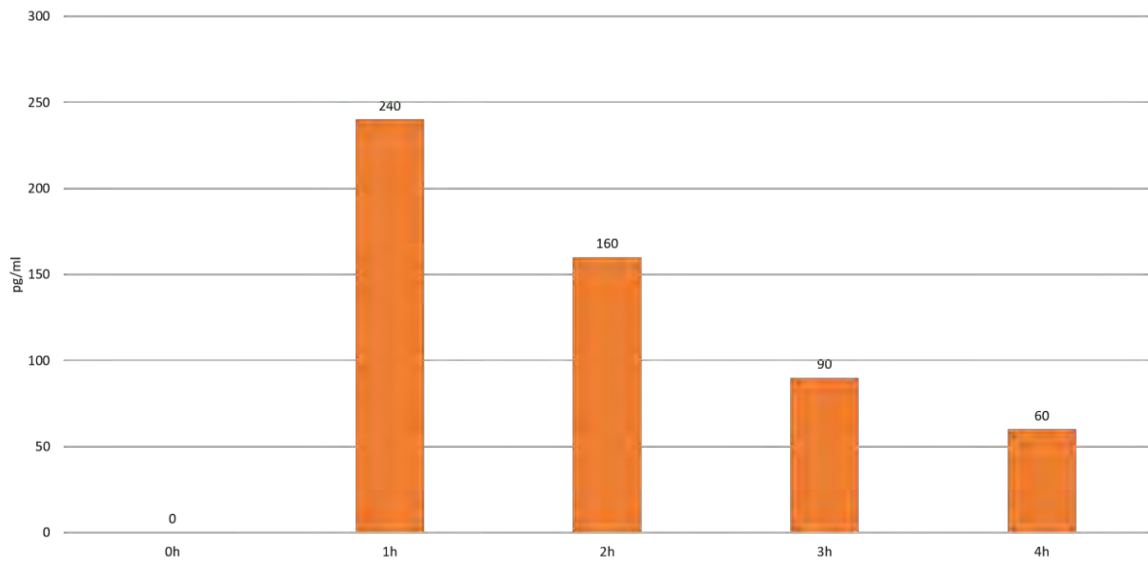


Figure 4. Blood anthocyanin concentration

Crossover study on 8 clinically healthy volunteers (4 male and 4 females), 25-65 years old. Lycotec, Cambridge, UK

ZAŁĄCZNIK 3

Odpowiedź Zarządu Cambridge Chocolate Technologies S.A. na pytania wskazane przez Towarzystwo Funduszy Inwestycyjnych Capital Partners S.A. z siedzibą w Warszawie w treści projektu uchwały do punktu 6 porządku obrad Zwyczajnego Walnego Zgromadzenia w sprawie wyboru, na koszt Spółki, rewidenta do spraw szczególnych

***Pytanie a:** czy posiedzenia oraz uchwały Zarządu i Rady Nadzorczej Spółki są protokołowane;*

Odpowiedź: Posiedzenia Zarządu oraz Rady Nadzorczej są protokołowane.

***Pytanie b:** czy liczba posiedzeń odbywanych przez Radę Nadzorczą, a także zakres jej aktywności ujawniony w treści protokołów z posiedzeń Rady Nadzorczej, uzasadnia poziom wynagrodzenia otrzymywanego przez poszczególnych członków Rady Nadzorczej, z uwzględnieniem standardów wynagrodzeń menadżerów spółek publicznych notowanych na GPW?*

Odpowiedź: Otrzymywane wynagrodzenie członków Rady Nadzorczej Cambridge Chocolate Technologies S.A. znajduje uzasadnienie przy liczbie odbytych posiedzeń oraz zakresie jej aktywności. Otrzymywane wynagradzanie nie przewyższa średniej wysokości wynagrodzeń członków zasiadających w innych radach nadzorczych spółek publicznych notowanych na GPW.

***Pytanie c:** czy Spółka odprowadza składki na ubezpieczenia społeczne oraz zdrowotne od świadczeń wypłacanych członkom jej Zarządu;*

Odpowiedź: Spółka odprowadza składki na ubezpieczenia społeczne oraz zdrowotne od świadczeń wypłacanych członkom jej Zarządu.

Pytanie d: ile wynosił zatwierdzony budżet Spółki na 2017 r.;

Odpowiedź: Budżet Spółki jest jej dokumentem wewnętrznym, a jego upublicznienie może wyrządzić spółce potencjalną szkodę przez ujawnienie tajemnic handlowych oraz organizacyjnych przedsiębiorstwa.

***Pytanie e:** jaka jest łączna wysokość należności Spółki wobec jednostek zależnych oraz powiązanych w rozumieniu ustawy z dnia 29.09.1994 r. o rachunkowości;*

Odpowiedź: Na koniec I kwartału 2019 roku łączna wysokość należności Spółki wobec jednostek zależnych oraz powiązanych wynosi 1.655 tys. PLN.

Pytanie f: z jakich zdarzeń prawnych wynikają należności Spółki wobec podmiotów zależnych oraz powiązanych, a w szczególności określonych w sprawozdaniu finansowym za 2017 r. jako „inne”;

Odpowiedź: Należności wskazane w sprawozdaniu finansowym w 2017 r jako „inne”, w kwocie 161.000 PLN dotyczą rozliczeń ze spółką CCT Ltd. UK, a ich przedmiotem jest finansowanie przez CCT S.A. kosztów CCT Ltd. związanych z rozwojem i sprzedażą produktów w Wielkiej Brytanii.

Pytanie g: czy ujawnione w sprawozdaniu finansowym Spółki za rok obrotowy 2017 należności Spółki wobec podmiotów zależnych oraz powiązanych są przeterminowane (wymagalne), a jeśli tak to, ile dni oraz jakie czynności Spółka podjęła w celu ich wyegzekwowania, jakie są stosowane wobec podmiotów zależnych i powiązanych terminy płatności oraz jakie sposoby zabezpieczenia wierzytelności Spółka stosuje w umowach z tymi podmiotami;

Odpowiedź: Na dzień 31 grudnia 2017 r., zgodnie z informacją wskazaną w opublikowanym sprawozdaniu finansowym za 2017 r., należności od podmiotów zależnych i powiązanych wynosiły 1 139 tys. PLN. Na dzień 31 marca 2019 wartość tych należności wynosi 239 tys. PLN. Kwota ta w szczególności dotyczy rozliczeń Spółki CCT S.A. ze spółką zależną CCT Inc i obejmuje refaktury kosztów operacyjnych oraz należności z tytułu sprzedaży produktów i półproduktów na terenie Stanów Zjednoczonych. Należność jest przeterminowana. Terminy płatności należności wobec podmiotów zależnych w 2017 roku wynosiły 14 lub 45 dni. Spółka nie stosuje zabezpieczeń wierzytelności wobec podmiotów zależnych.

Pytanie h: jakie procedury oraz zasady regulujące zarządzanie należnościami obowiązują w Spółce oraz czy określają one (a jeśli tak, to w jaki sposób) terminy podejmowania działań windykacyjnych, obowiązki dokładania staranności przy weryfikowania kontrahentów, zasady zabezpieczania transakcji o znacznej wartości, dokładania staranności, aby należności nie uległy przedawnieniu;

Odpowiedź: Procedury oraz zasady regulujące zarządzanie należnościami są zależne od danego kontrahenta. Spółka we własnym zakresie dokonuje starannej oceny wiarygodności kontrahentów. Podstawową formą zabezpieczenia oraz weryfikacji partnera jest konieczna przedpłata za każde pierwsze zamówienie, a w przypadku konieczności wykonania materiałów dedykowanych, konieczność przedpłaty dotyczy również kolejnych dostaw.

Pytanie i: jaka była łączna wartość umorzonych przez Spółkę w 2016 r. i w 2017 r. pożyczek, jakie podmioty były beneficjentami tych pożyczek oraz co było powodem umorzenia każdej z nich;

Odpowiedź: Spółka nie umorzyła w 2016 roku żadnej pożyczki. Pożyczki umorzone w 2017 r. wynosiły łącznie 1 190 tys. PLN i dotyczyły pożyczki udzielonej Lycotec Limited - spółki zależnej wynalazcy Technologii, na potrzeby związane z rozwojem Technologii oraz rozwijanych na ich bazie produktów. Umorzenie miało związek ze wzajemnymi rozliczeniami Stron w ramach podpisanej umowy licencyjnej między stronami..

Pytanie j: na jakie podmioty (co najmniej cztery) były największymi beneficjentami wydatków dokonywanych przez Spółkę w latach 2016 i 2017, które zostały zaksięgowane jako „Usługi obce” i czy wydatki te były uzasadnione rzeczywistymi potrzebami Spółki lub jej interesem;

Poniesione wydatki były uzasadnione rzeczywistymi potrzebami Spółki. W roku 2017 największymi dostawcami usług obcych byli:

1. Lycotec Limited – opłaty licencyjne dla Wynalazcy oraz finansowanie kosztów prowadzonych prac rozwojowych szczegółowo opisanych w Dokumencie Informacyjnym.

2. Adiuvo Investments S.A. – refaktura kosztów ponoszonych przez Adiuvo Investments S.A. bezpośrednio związanych z działalnością Spółki (szczegółowo omówionych poniżej w odpowiedzi na pytanie m)
3. Pomiot niepowiązany, zewnętrzny – usługi przewozowe.
4. Podmiot niepowiązany, zewnętrzny – usługi marketingowe oraz rozwoju sprzedaży.

W roku 2016 największymi dostawcami usług obcych byli:

1. Adiuvo Investments S.A. – refaktura kosztów ponoszonych przez Adiuvo Investments S.A. bezpośrednio związanych z działalnością Spółki (szczegółowo omówionych poniżej w odpowiedzi na pytanie m)
2. Nutra Sp. z o.o. – refaktura kosztów ponoszonych przez Nutra Sp. z o.o. bezpośrednio związanych z działalnością Spółki (szczegółowo omówionych poniżej w odpowiedzi na pytanie m)
3. Pomiot niepowiązany, zewnętrzny – usługi marketingowe oraz rozwoju sprzedaży
4. Podmiot niepowiązany, zewnętrzny – doradztwo regulacyjne dla produktów z portfolio

Pytanie k: *na jakie podmioty (co najmniej cztery) były największymi beneficjentami wydatków dokonywanych przez Spółkę w latach 2016 i 2017, które zostały zaksięgowane jako koszty ogólnego zarządu i czy wydatki te były uzasadnione rzeczywistymi potrzebami Spółki lub jej interesem;*

Odpowiedź: Spółka w tym okresie sporządzała Rachunek zysków i strat w wersji porównawczej i w związku z tym nie prowadziła ewidencji kosztów umożliwiającej grupowanie kosztów w kategorii kosztów ogólnego zarządu.

Pytanie l: *jakie rodzajowo koszty składały się na koszty zakwalifikowane przez Spółkę podatkowo jako „pozostałe koszty operacyjne” oraz „pozostałe koszty rodzajowe” w latach 2016-2017;*

Odpowiedź: W skład pozostałych kosztów operacyjnych zarówno w roku 2016 jak i w roku 2017 wchodziły m.in.: odpisy aktualizujące towary, odpisy aktualizujące należności, różnice kursowe, utylizacja. W skład pozostałych kosztów rodzajowych w roku 2016 i 2017 wchodziły: koszty reklam, szkoleń, podróże służbowe, ubezpieczenia.

Pytanie m: *zakupu jakich usług i towarów dokonała w latach 2016 i 2017 Spółka od (i)jednostki dominującej (za 1,825 mln zł w 2016 r. i 1,78 mln w 2017 r.), (ii)jednostek zależnych (za 141 tys. zł w 2016 r. i 835 tys. zł w 2017 r.), oraz (iii)kluczowego personelu kierowniczego Spółki (za 215 tys. zł w 2016 r.) oraz czy zakup tych usług i towarów był uzasadniony rzeczywistymi potrzebami Spółki lub jej interesem;*

Odpowiedź: Zakup usług i towarów w 2016 oraz 2017 r. od jednostek dominujących (Adiuvo Investments S.A. oraz Nutra Sp. z o.o.) dotyczył w szczególności:

- i. w przypadku spółki Adiuvo Investments S.A. - refaktury kosztów pracowników działu marketingu i sprzedaży oraz administracyjnych, którzy zostali zatrudnieni w Spółce matce, a następnie skierowani do świadczenia usług na rzecz spółki CCT. S.A.
- ii. w przypadku spółki Nutra Sp. z o.o., będącej w miejsce Spółki, do marca 2017 roku, stroną ramowej umowy Master License Agreement - refaktury kosztów usług

kancelarii zajmujących się ochroną własności intelektualnej i znaków towarowych oraz finansowania kosztów prowadzonych prac rozwojowych przez Lycotec Limited.

Zakup usług i towarów w 2016 oraz 2017 r od jednostek zależnych dotyczył finansowania kosztów logistycznych, obsługi targów branżowych, kosztów patentowych, wykonania animacji na rzecz spółki CCT S.A., a także pozostałych kosztów operacyjnych niezbędnych do finansowania działalności na rynkach zagranicznych obsługiwanych przez dane spółki zależne.

Zakup usług i towarów w 2016 r od kluczowego personelu kierowniczego dotyczył, zgodnie z podpisaną umową licencyjną rozliczeń royalties (procent od wartości sprzedaży) dla spółki Lycotec Limited.

Pytanie n: czy Spółka wykonuje testy na utratę wartości przez jej aktywa, a jeśli tak to jak często i czy testy te obejmują zapasy, należności oraz aktywa niematerialne Spółki;

Odpowiedź: Spółka sporządza sprawozdania finansowe według MSSF. Zgodnie z przyjętą polityką rachunkowości dokonuje testów na utratę wartości. Wartość firmy oraz inne wartości niematerialne o nieokreślonym okresie użytkowania podlegają obowiązkowym corocznym testom na utratę wartości. Pozostałe aktywa niefinansowe testuje się na utratę wartości, ilekroć jakieś zdarzenia lub zmiany okoliczności wskazują na ryzyko niezrealizowania ich wartości bilansowej. Na koniec każdego okresu sprawozdawczego dokonuje się również oceny, czy występują obiektywne dowody na to, że składnik aktywów finansowych utracił wartość. Testy te obejmują zapasy, należności oraz aktywa niematerialne Spółki

Pytanie o: jakie są przyczyny spadku przychodów Spółki ze sprzedaży w poszczególnych kwartałach 2017 r. oraz czy i w którym okresie raporty kwartalne Spółki zawierały korekty wcześniejszych sprzedaży;

Odpowiedź: Zgodnie z informacją zamieszczoną w rocznym sprawozdaniu zarządu za rok 2017, w szczególności w liście Zarządu do akcjonariuszy przyczyną spadku przychodów Spółki był niższy potencjał kanału „professional beauty” niż zakładano z lokalnymi partnerami. Analiza sprzedaży w 2017 roku doprowadziła do rewizji modelu biznesowego na większości rynków, gdzie Esthechoc był sprzedawany.

W 2017 roku oraz w latach kolejnych wystawione korekty do sprzedaży osiągniętej w 2017 roku (i wykazanej w sprawozdaniu finansowym za 2017 r) nie przekroczyły 5% wartości tej sprzedaży.

Pytanie p: w którym momencie procesu sprzedaży księgowany jest w Spółce przychód;

Odpowiedź: Przychód ewidencjonowany jest w momencie wystawienia faktury sprzedaży.

Pytanie q: ile łącznie opakowań produktu Esthechoc oraz Rechoc (z podziałem na poszczególne rynki) zostało zamówionych od Spółki, a ile sprzedanych w 2017 r.?

Odpowiedź: Sprzedaż produktów Esthechoc i Rechoc realizowana jest na bieżąco zgodnie z otrzymanymi zamówieniami. W 2017 r. Spółka sprzedała ok 90 tys. pudełek czekolady Esthechoc (z czego ponad 40% na rynek azjatycki, 15% na rynek amerykański, 12% na rynek Bliskiego Wschodu) oraz ponad 10 tys. pudełek czekolady ReChoc (z czego ponad 95% sprzedaży na rynek amerykański).

Pytanie r: czy w latach 2016-17 Spółka prowadziła sprzedaż produktów na rynku tajwańskim oraz jaka była wartość tej sprzedaży;

Odpowiedź: W latach 2016 i 2017 Spółka prowadziła sprzedaż na rynku tajwańskim. Poziom sprzedaży przedstawiony znajduje się w opublikowanych sprawozdaniach finansowych.

Pytanie s: jaki jest stan zapasów Spółki i ich wartość bilansowa, w szczególności materiałów, półproduktów i produktów, których okres przydatności do wykorzystania upłynął lub upłynie w ciągu 12 miesięcy od daty rozpoczęcia badania przez Biegłego;

Odpowiedź: Stan magazynowy na dzień 31 marca 2019 wyniósł 1 778 156,09 PLN, z czego towarom na kwotę około 249 tys. PLN upłynął termin ważności, a towarom na kwotę około 10 343 PLN upłynie w ciągu najbliższych 12 miesięcy.

Pytanie t: ile i jakiego rodzaju towary, ujęte w sprawozdaniu finansowym za 2017 r. jako zapasy, Spółka posiadała na dzień sporządzenia tego sprawozdania;

Odpowiedź: Są to głównie opakowania, które nie posiadają terminu ważności oraz surowce, którym termin ważności minie w 2020 roku.

Pytanie u: jaka była wysokość kosztów marketingowych poniesionych przez Spółkę w latach 2014-2017 na promocję produktów, które były oznaczone znakiem towarowym, lub znakiem wspólnotowym bądź którego kształt był oparty na wzorze przemysłowym lub wzorze wspólnotowym, do których prawa ochronne przysługują Ivanowi Petyaevowi, spółce pod firmą Nutra spółka z ograniczoną odpowiedzialnością z siedzibą w Warszawie, spółce pod firmą Lycotec Limited z siedzibą w Cambridge, spółce pod firmą IMM D spółka z ograniczoną odpowiedzialnością z siedzibą w Warszawie lub spółce pod firmą IP Science Limited z siedzibą w Cambridge;

Odpowiedź: Szczegółowe zestawienie podmiotów, którym przysługują prawa ochronne znajduje się poniżej w odpowiedzi x. Spółka nie ponosi kosztów marketingowych dla produktów, do których znaków towarowych nie ma wyłącznych i nieograniczonych rodzajowo i terytorialnie praw.

Pytanie v: jakie były poniesione przez Spółkę w latach 2016-2017 łączne koszty reprezentacji, wyjazdów służbowych, spotkań służbowych poza siedzibą spółki oraz wydatków na urządzenia służbowe (m.in. telefony, komputery, samochody);

Odpowiedź: Łączne koszty związane z reprezentacją i wyjazdami służbowymi w latach 2016 – 2017 dotyczyły w głównej mierze podróży służbowych i wynosiły one odpowiednio 189 tys. PLN w 2016 r. oraz 286 tys. PLN w 2017 r.

Pytanie w: czy Spółka samodzielnie opracowuje technologie, receptury, sposoby produkcji, wyglądy opakowania, nazwy oraz strategie sprzedaży produktów, które wprowadza na rynek, a jeśli wykonuje jedną lub więcej z powyższych czynności przy współpracy z innym podmiotem, to czy zawiera umowy, które to regulują oraz czy umowy te przewidują przejście na Spółkę praw do technologii, receptur, sposobów produkcji, wyglądków opakowań, nazw produktów oraz innych pomysłów i know-how dotyczącego produktów wprowadzanych na rynek przez Spółkę;

Odpowiedź: Spółka nie opracowuje samodzielnie technologii, receptur, sposobów produkcji, wyglądu opakowania oraz nazw. W ramach technologii i receptur Spółka współpracuje na podstawie umowy licencyjnej z Wynalazcą. Pozostałe powyżej wymienione czynności wykonywane są we współpracy z zewnętrznymi partnerami. Każdorazowo Spółka, w ramach podpisanych umów, nabywa pełne prawa do stosowania opracowanych elementów.

Pytanie x: na podstawie jakich umów oraz jakich tytułów prawnych Spółka korzysta ze znaków towarowych, znaków wspólnotowych, wzorów przemysłowych, wzorów użytkowych oraz wzorów wspólnotowych, wykorzystywanych w produktach, które wytwarza lub wprowadza na rynek;

Odpowiedź: Znaki towarowe pod którymi sprzedawane są produkty grupy Cambridge Chocolate Technologies S.A. (dalej również „CCT”) są globalnie chronione, a wprowadzone na rynek produkty mają status suplementów diety lub produktów żywności ogólnego spożycia. Na podstawie zgłoszeń własnych oraz podpisanych umów sublicencji oraz licencji ze spółką Nutra Sp. z o.o. (obecnie Adiuvo Investments S.A.) Cambridge Chocolate Technologies posiada wyłączne i nieograniczone terytorialnie i rodzajowo prawa do korzystania ze znaków towarowych dla komercjalizowanych produktów.

Poniższa tabela wskazuje listę znaków, do których Spółka posiada nieograniczone prawa

	Znak	Data pierwszeństwa	Zgłaszający
1.	Esthechoc	15.10.2014	Nutra Sp. z o.o.
2.	Esthechoc Cambridge Beauty Chocolate	31.01.2015	Nutra Sp. z o.o.
3.	Rechoc	30.01.2017	Cambridge Chocolate Technologies S.A.
4.	Fount	08.05.2017	Cambridge Chocolate Technologies S.A.
5.	Elate	28.05.2019	Snack Magic Brands Inc*
6.	Cambridge Chocolate Technologies	24.06.2015	Nutra Sp. z o.o.**

**Snack Magic Brands Inc.* – spółka dedykowana do komercjalizacji produktów z wysoką zawartością polifenoli na rynku amerykańskim, kanadyjskim oraz meksykańskim. Podmiot w 100% zależy od Cambridge Chocolate Technologies S.A.

***Nutra Sp. z o.o.* – zgodnie z informacjami wskazanymi w dokumencie informacyjnym w latach 2014-2017 licencjobiorca technologii Lycotec Ltd. oraz IP Science Ltd. W dniu 17 grudnia 2018 roku Nadzwyczajne Zgromadzenie Wspólników Nutra sp. z o.o. podjęło Uchwałę nr 2 w sprawie połączenia Biovo sp. z o.o., Nutra sp. z o.o., StokPl sp. z o.o. oraz OryxPl sp. z o.o. z Adiuvo Investment S.A. Jednostka została przejęta przez Adiuvo Investments S.A. 4 lutego 2019 roku.

Portfolio znaków towarowych Spółki znajduje się aktualnie pod opieką prawną kancelarii KM Partners Komorowska Michaliszyn Kancelaria Radców Prawnych i Doradców Podatkowych sp. p., Warszawa, Polska oraz Cummings Law LLP, Ohio, USA.

Pytanie y: jaka jest łączna wartość aktywów Spółki w postaci nabytych koncesji, patentów i licencji oraz kosztów prac rozwojowych (w tym również niezakończonych) ujętych w sprawozdaniu Spółki za 2017 r. jako „wartości niematerialne”;

Odpowiedź: Pozycja „wartości niematerialne i prawne” w roku 2017 miała wartość 9 472 tys. PLN i składały się na nią głównie prace badawczo-rozwojowe na kwotę 6 210 tys. PLN, zakończone prace

rozwojowe na kwotę 1 698 tys. PLN oraz inne wartości niematerialne i prawne (know-how) na kwotę 1 564 tys. PLN.

Pytanie z: jaka była wysokość kosztów poniesionych przez Spółkę w latach 2014-2017 z tytułu korzystania z praw do znaków towarowych, znaków wspólnotowych, wzorów przemysłowych, wzorów użytkowych oraz wzorów wspólnotowych, do których wyłączne prawa ochronne przysługują Ivanowi Petyaevowi, spółce pod firmą Nutra spółka z ograniczoną odpowiedzialnością z siedzibą w Warszawie, spółce pod firmą Lycotec Limited z siedzibą w Cambridge, spółce pod firmą IMMD spółka z ograniczoną odpowiedzialnością z siedzibą w Warszawie lub spółce pod firmą IP Science Limited z siedzibą w Cambridge;

Odpowiedź: Szczegółowe zestawienie podmiotów, którym przysługują prawa ochronne znajduje się poniżej w odpowiedzi x. Spółka nie ponosi kosztów związanych z ochroną znaków towarowych, do których nie ma wyłącznych i nieograniczonych rodzajowo i terytorialnie praw. Do 31.03.2019 roku Spółka bezpośrednio łącznie wydała na ochronę znaków towarowych kwotę około 350 tyś. PLN. Poniesione koszty obejmują wyłącznie znaki towarowe, do których Spółka posiada nieograniczone rodzajowo i terytorialnie prawa.

Pytanie aa: które technologie na bazie, których powstają produkty komercjalizowane przez Spółkę mają zabezpieczoną własność intelektualną i jakim podmiotom te prawa przysługują,

Pytanie bb: czy technologie na bazie, których powstają produkty komercjalizowane przez Spółkę mają globalnie zabezpieczoną własność intelektualną, a jeśli nie to na jakim obszarze geograficznym ta własność intelektualna jest zabezpieczona;

Odpowiedź: Wg najlepszej wiedzy Zarządu wszystkie technologie na bazie których powstają produkty komercjalizowane przez Spółkę mają zabezpieczoną własność intelektualną. Spółka nabyła od Spółek IP Science oraz IMMD Sp. z o.o. wyłączne, nieodwołalne i nieograniczone czasowo i terytorialnie prawo do komercjalizacji i sprzedaży produktów w obszarze słodczy funkcjonalnych, żywności i suplementów diety. Poniższa tabela opisuje poszczególne zgłoszenia wraz z powiązaniem zgłoszeń patentowych z rozwijanymi produktami.

	OPIS ZGŁOSZENIA	DATA PIERWSZEŃSTWA	TECHNOLOGIA	PRODUKT
Functional Chocolate	Wynalazek odnosi się do żywności funkcjonalnej składającej się z produktów, w których wykorzystano ziarno kakaowe oraz ekstrakt roślinny bogaty w polifenole. Takie połączenie skutkuje nieoczekiwanymi korzyściami zdrowotnymi a jednocześnie redukuje lub zapobiega po posiłkowym skokom poziomu glukozy we krwi. Odkrycie ma zastosowanie m.in. w mlecznej czekoladzie, nadając jej właściwości zbliżone do ciemnej (gorzkiej) czekolady lub do kremu czekoladowego, czy czekolady ciemnej wzmagając jej właściwości prozdrowotne. Właściwości te to m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwdziałające hipoksji (niedotlenieniu) tkanek, czy wspierające układ krążenia.	2016-11-10	ChocBerry	Rechoc, Elate
Lycosome Micelle Technology – carotenoids particles and use thereof	Odkrycie odnosi się do sposobu dostarczenia cząsteczek do krwiobiegu po podaniu doustnym. Zastosowanie technologii Lycosome (będącej połączeniem karotenoidu oraz ewentualnie cząsteczki cargo) chroni te substancje przed degradacją w układzie trawienia	2011-01-31	Astacelle	Esthechoc Mitochoc

	oraz poprawia wchłanianie w formie niezmodyfikowanej a przez to podnosi ich biodostępność we krwi. Umożliwia to zmniejszenie dawki koniecznej do osiągnięcia danego efektu lub podniesienie skuteczności dotychczasowej dawki substancji.			
Acid Inflammatory Oxidation & its control – product and method (tytuł oryginalny: Products and methods)	Wynalazek dotyczy odżywczych, kosmetycznych, profilaktycznych i terapeutycznych zastosowań grzybów spożywczych, produktów fermentacyjnych i ich ekstraktów. Wynalazek odnosi się w szczególności do obniżenia podwyższonego poziomu cholesterolu i/lub trójglicerydów, jak również do leczenia lub zapobiegania infekcji, zapalenia, uszkodzeń zapalnych, miażdżycy, chorób serca, chorób żołądka, stanów zapalnych jelit i wątroby oraz ich powikłań, a także do promowania lub stymulowania regeneracji lub leczenia ran, oparzeń, owrzodzeń lub innych form uszkodzonych lub starzejących się tkanek. Wynalazek zastrzega dodatkowo test do oceny stanu zapalnego uszkodzeń oksydacyjnych (IOD) obejmującego: a) otrzymanie próbki tkanki ludzkiej, homogenatu próbki tkanki, surowicy lub osocza; b) dodanie źródła jonów wodorowych zdolnych do działania jako substrat dla dysmutazy nadtlenkowej; c) inkubacja próbki przez 6-24 godziny; oraz d) wykonanie testu MDA w celu określenia poziomu utlenienia.	2011-09-06	Astacelle, Chocberry	Esthechoc Rechoc MitoChoc Elate
Resveratrol Antibodies & Assay (Oryginalny tytuł: Antibody specific for trans - resveratrol and use thereof)	Metoda wykorzystanie specyficznych dla trans – resweratrolu przeciwciał do oceny jego stężenia w próbce. Patent opisuje także wytworzenie przeciwciał przeciw trans – resweratrolowi.	2011-11-11	Astacelle, Chocberry	Rechoc
Anti-lipoprotein antibodies & complex – method and assessing risk of atherosclerosis (tytuł oryginalny: Diagnosis and treatment of atherosclerosis)	Wynalazek dotyczy identyfikacji przeciwciał utleniających lipidy jako kluczowego czynnika chorobotwórczego w chorobach miażdżycowych. Obecność takich przeciwciał jest ważnym wskaźnikiem diagnostyki i prognozowania takich zaburzeń, a także przedstawia metody i środki oceny stanu miażdżycy. Metody opisane w wynalazku są przydatne w diagnostyce klinicznej, prognozowaniu, profilaktyce i terapii miażdżycy oraz zaburzeń pokrewnych, a także w uzyskaniu pomiaru poziomu utlenienia lipoprotein .	2001-08-22	Astacelle, Chocberry	Esthechoc Rechoc MitoChoc Elate

Pytanie cc: na jakie badania kliniczne Spółka pozyskała granty od 2016 r. do dnia sporządzenia opinii przez Biegłego;

Pytanie dd: jaka jest łączna wysokość środków pozyskanych przez Spółkę na badania kliniczne na podstawie umów grantowych zawartych od 2016 r. i w jakim stopniu środki te zostały wydatkowane oraz rozliczone przez Spółkę z grantodawcą.

Odpowiedź: Spółka nie pozyskała żadnych środków na badania kliniczne na podstawie umów grantowych zawartych od 2016 r. W III kw. 2016 r. Spółka uzyskała możliwość dofinansowania w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 działanie 1.1/poddziałanie 1.1.1. na kwotę prawie 6,5 mln PLN. Ostatecznie w ramach rozmów z Instytucją Pośredniczącą Spółka, ze względu na niekorzystne zapisy umowy grantowej (w szczególności brak elastyczności przy wdrażaniu potencjalnych zmian w planie badawczym co jest elementem koniecznym przy rozwoju produktów innowacyjnych) nie zdecydowała się na podpisanie umowy o dofinansowanie.