

COMPARABILITY CONSIDERATIONS IN THE DEVELOPMENT OF GENE THERAPY PRODUCTS

CASSS Cell & Gene Therapy Products (CGTP): Manufacturing, Quality and Regulatory Considerations

Robert Baffi, Ph.D, MBA BioMarin Pharmaceutical, Inc. Executive Vice President Technical Operations

VALOCTOCOGENE ROXAPARVOVEC (BMN 270) GENE THERAPY TREATMENT FOR HEMOPHILIA A

Clinical Results

- Safety
- Reduction in Annualized Bleeding Rate and Use of Recombinant Factors
- Increase in Quality of Life (QOL) Measures
- Sustained Factor VIII Levels 2 Years After a Single Infusion of BMN 270
- Summary and Next Steps

Process Comparability: Factors That Impact Potency

- Capsid Protein Content
- Deamidation of Capsid Proteins
- Presence of Empty Capsids

HEMOPHILIA IS THE OLDEST DESCRIBED GENETIC DISORDER

'. .if the first son of a woman is circumcised and he dies and the second son is circumcised and he dies, you must not circumcise the third son. .

> additionally, the sons of the woman's sister should not be circumcised but the sons of her brother can be circumcised. " Talmud (Yebamot 64b)

> > micao. (0.35 6 Term: 0.7

לי שטידט כמס שכבים שנה אמינ המוז קרוז בחפלה משה הונכחס. נפשה לי זכרות: טרק סדב הסרומו הוד לארו שהליע שוד כך אבל משה הגיע ושריד היס (שדי לי) : לין שריד: לא שני דשויה ששר

בעו מיניה מרכ יוסף . אריי דגראה שאאטי הלכה כרכי אי כרשכינ האלד ותרש לכל פיטר ושיטר ושיטר ושיטר ושיטר ושיטר ושיטר ושיטר ושיטר אשינו דהלכה כשניהם :

חתוכתם האל מקבת בוד נוקרתם וכתוב הביסו אל אברהם אביכם האל שרה: תחללכס אפר רב נחמן אפר רבה בראבוה שרה אכנו "אילונית היתה שנאמר "ותהים שרי עקרה אין לה ולר אפוי בית ולר אין לה אפר רב יהורה טריה דרב שמואל בר

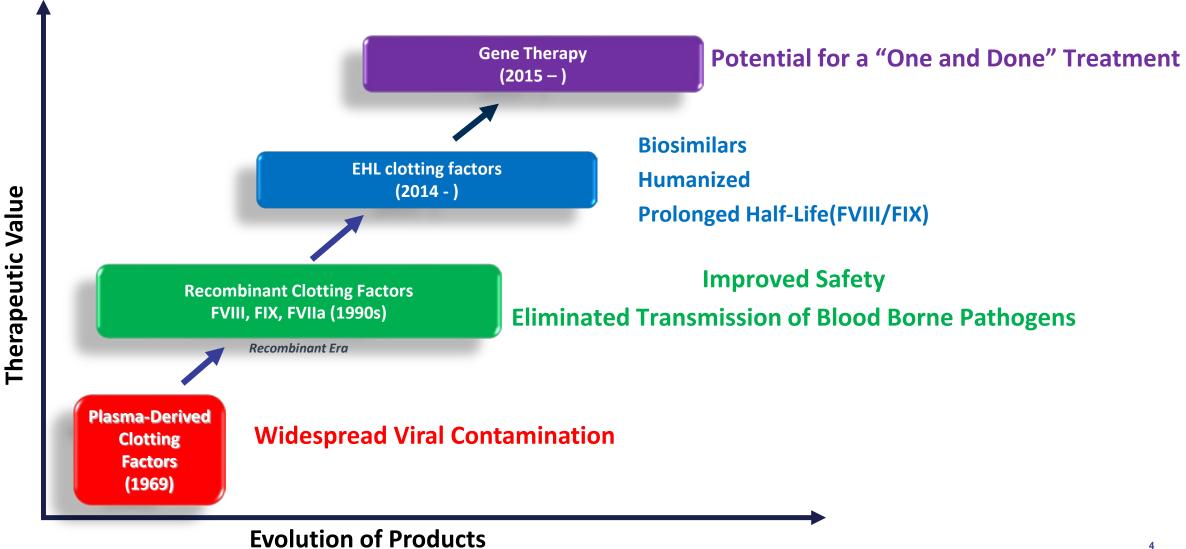
שילת פשמיה דרב לא שנו אלא בחורות הראשונים ששנותיתן מרובות אבל בחורות האררונים ששנותיהן פועמית שתי שנים ומחזרה כנגר שלשה עיבורים רבה אמר רב נרמן שלש שנים כנגר שלש פקירוח *ראמר כדי בריה נפקרו שרה רחל ורעה אפר רכה ליתנהו להני כללי מכרי מהני טאן הקו

דרובן מי שלקה ושנה כו'. הקשה משה הבהגשרופיום 20 (מסדרין איז : ושם) תורך לה אפיט הרפכיב ותבירות מתוקות ואמר chart ritted and one ריץ נקבינ דלדכת הגל הקס האמר בבירו מהקיח ולפי להקס המכועה הנשיע ליק לכק המכועה המקיח ולפי להק לכק מכיעה מליחה מהקיח העליק לסק מכיעה מרשיע מהקים האל הקס מכיעה מהקיח המכיעה היום הניינים מרשים מקר לסק מכיעה מרשים מהקים היום הניינים מרשים מהקים היום הניינים מרשים מהקים היום מכיעה מרשים מהקים היום הניינים מרשים מרשים מרשים מכול הניינים היום הניינים מרשים מרשים מרשים מרשים מרשים מרשים מרשים מרשים מרשים הניינים מרשים ADD PACIFIC 330 0000000 רב יוסף דכיפה לריכה התרחה : 2151

ליות אבימי הור אימעום שני דמתני כללי מכרי מתרי מאן חקן והאי שמא לא זכה להבנות הימנה ורלמא איהי דלא זביא איהי כיון דלא מערישמא לא זכה להבנות הימנה ורלמא איהי דלא זביא איהי כיון דלא בד זכרא נסיב איהתא ואיליר בני ואמר להו אי זכאי הזו לי מקמייתא ההם רדצי קא מרחי לדצ לרכגן דרי אמר להו אי זכאי הזו לי מקמייתא הומא רב נידל איעקר מפרקיה דרב הונא רבי חלבו איעקר מפרקיה הדב לימתיותא מליה באלוא דבי רב נומה בים המנא רב ארא בר יעקב אהרתיה ססבינתא תליוה בארוא דבי רב ונפק כוניה כהוצא ירקא אמר רב ארא בך יעקב שותין סבי הוינא וכולהו איעקור מפרקיה דרב הונא לבר מאנא רקיימי בנפשאי "ההכמה הירה בעליה גירשה מוהרת ובו" : "שני אין שלישיאי לא מתניהן פני "רבי הוא התניא "כלה הראשוקוכת שני וכת שליש לא תכול רברי רבן שמעון בן נמליאל אומר *שלישי תכול רביעי לא תמול והתגיא איפכא יהי סינייהו אחריניחא חיש ראסר ר' חייא בר אכא איר יותנן 'פעשה בארבע ארוות בזפורי שטלה ראשונה וכת שניה וכר אבא אד יותן יטעשה בארבע ארוות בזפורי שטלה ראשונה וכת שניה וכת שלישים וכת רביעית באת לפני רבן שטעון כן נפלאל אפר לה אל תכולי ודלסא אי אתיא שלישית נכי הת אבר לה איכ סאי אסתרותיה דרי חויא בר אבא ודלפא הא קביל ראחוות פתוקות אפר רבא השתא דאפרת אחוות פתוקות ילא ישא ארם אשת לא ממשפחת נכפין ולא ממשפחת מצורעים והוא האתחיק תלתא זיכני כאוי הוה שלה כי אתא רב יצחק כר יוסף אמר עיברא הוה קטית רדי יותנן בבנישתא רסעון ביוהיכ שחל להיות בשבת ומלה ראשונה ומת שניה ומת שלישית באה לפניו, אמר לה לכי ומולי א'ל אביי חיי רקשרית איסרא וסכנתא סכך עלה אביי ואול נסכת לחומה ביותא ראיסי בריה דרב יזחק בריה דרב יהודה דנסבה רחבא רפופבדיתא ושכיב רב יצחק בריה הרכה בר הנה ושכיב ונסכה הוא ושכיב אמר רבא ומי איכא רעביר ערברא בנפשרה כי האי והא איתו ראפר אבין רספכא יצחק סומקא לאי בר עובדא בנפשיה כי האי היא איהו האסר אבין הספא יצחק סופיקא לאי בר ספבא אבין יישנו בהורה יצחק סופקא אינו בחורה ועוד איפר הפליני לענין מילה בנישואין פי פליני אין והתניא "יניסת לראשון ומת לשני ובת לשלישי לא תנשא הברי רכי רבן שפעון בן נפליאל איפר לשלישי תנשא להביע לא תנשא בשלפא נבי פולה איכא פשפתה הרפי רפא ואיכא משפדה קסרים דפא אלא נישואין פים איל רב פרדכי להב אשי הבי אמד אביני קסרוניא פשפתה הרב הונא פעין נורס ווב אשי אפר יפול נורם פאי בניית "איכא בינייהי דאירמה ופיח אי נפי דופאל פריקלא ופיח איל רב יוסף בריה הרה להא לא פרבי פוניה מרב יוסף הלכת כרבי ואפר לי אין הלכה סרבן שפגעון כן נפליאל ואפר לי אין אתור המישר מרים לא פריק שפגעון כן נפליאל ואפר לי אין אתורי המינה כרבי ואפר לי אין ופשרם לר גישוא ופליה וניסיות כרבי ופעות המינה האוד המישור מרכני שי איל לא מרפין "היא ופשרם שמעין בן נטליאל ואסד לי אין ארוכי אדוך ביאיל לא סרפי ידוא ופשים לך גישואין וטלקות כרבי וסרצחוישור המועד כרכן שמעון כן גטליאלגישואין הא ראשרן טלקות רתנן *יטי שלקה ושנה ב"ר כונסין אותו לכיפת וןכאכילין אורצ שעורים עד שתהא כריסו נכקעת וסתות דתנן *יאין האשה quay

3

EVOLUTION OF HEMOPHILIA TREATMENT



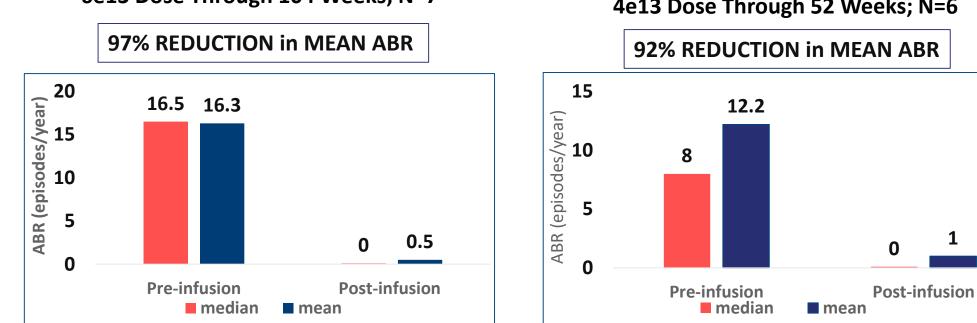
4

FAVORABLE SAFETY PROFILE FOR BMN 270

- Transient transaminitis
 - 73% of subjects; now all resolved
 - 93% Grade 1, 7 % Grade 2; Alanine Aminotransferase (ALT) elevation
 - Median onset at 7.6 weeks; duration <25.3 weeks post onset
- All patients are off corticosteroids
- No patients developed inhibitors to FVIII; no subject withdrew
- 2 SAEs, both self-limited
 - Pyrexia, resolved overnight
 - Total knee replacement for pre-existing arthropathy
- Most common other AEs across all dose cohorts:
 - Arthralgia (60%); headache (47%), back pain (40%)
 - Viral upper respiratory tract infection (40%), fatigue, insomnia, pain in extremity (33%)

SUBSTANTIAL REDUCTION IN TREATED ANNUALIZED BLEED RATE (ABR)

STARTING FROM 4 WEEKS POST-INFUSION



6e13 Dose Through 104 Weeks; N=7

4e13 Dose Through 52 Weeks; N=6

% Patients Bleed Free

Baseline	Year 1	Year 2
15%	71%	86%

All patients off prophylaxis **100%** resolution in target joints

% Patients Bleed Free

Baseline	Year 1
17%	83%

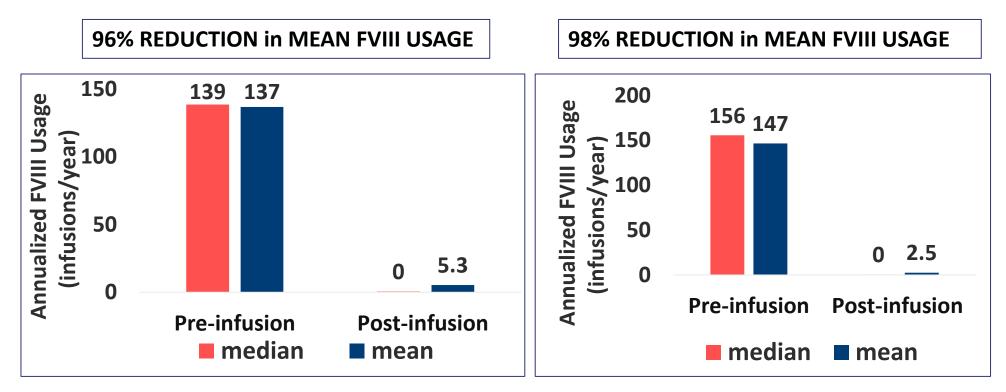
All patients off prophylaxis

SUBSTANTIAL REDUCTION IN MEAN ANNUALIZED FVIII USAGE

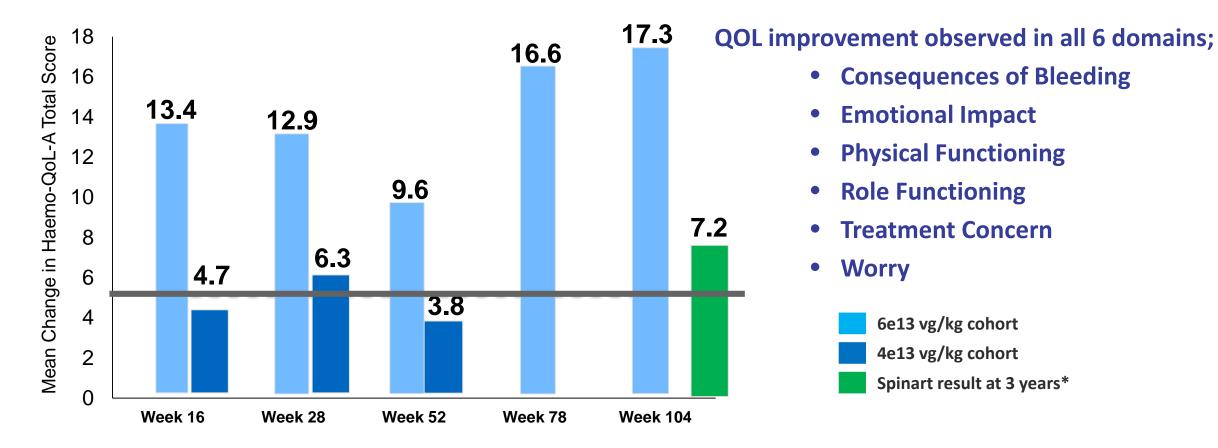
STARTING FROM 4 WEEKS POST- INFUSION

6e13 vg/kg Dose Through Week 104; N=7

4e13 vg/kg Dose Through Week 52; N=6



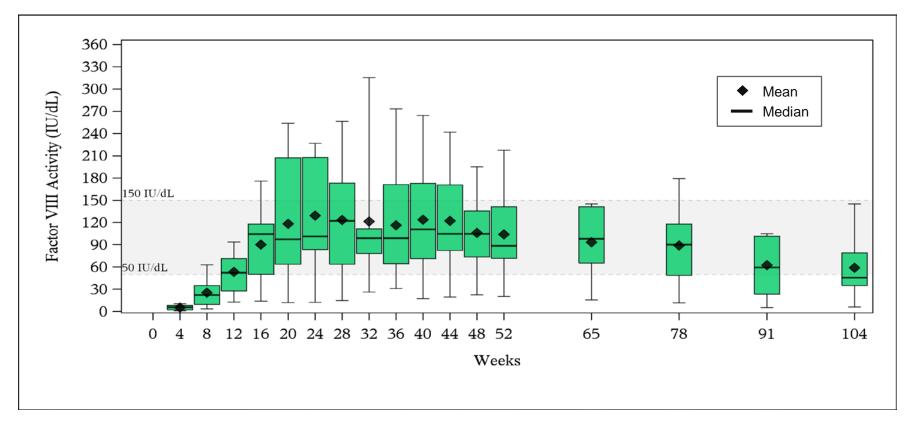
BMN 270 SUBSTANTIALLY IMPROVED QUALITY OF LIFE



Grey line indicate distribution based minimally clinical important difference (MCID) at lower threshold* Pocoski J et al., 2014

Randomized, controlled, parallel-group trial of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant factor VIII in adults with severe hemophilia A (SPINART). J Thromb Haemost. 2014 Jan;12(1):119-22.

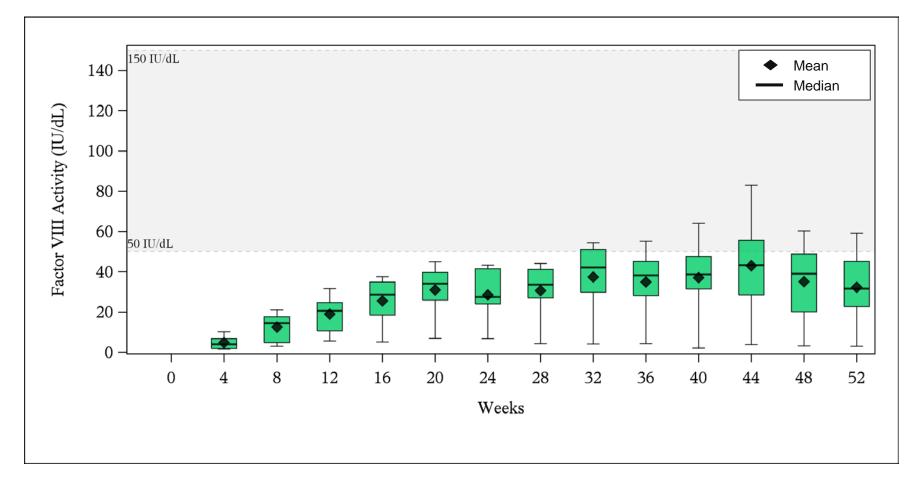
MEAN FVIII ACTIVITY LEVELS SETTLING IN NORMAL RANGE (6e13 VG/KG)



No FVIII Activity Above Upper Limit of Normal at 2 Years

The upper and lower box bounds represent 25th and 75th percentiles. The whisker lines represent the minimum and maximum values.

MEAN FVIII ACTIVITY LEVELS AT HIGH END OF MILD RANGE (4e13 VG/KG)



No FVIII Activity Above Normal at 1 Year

The upper and lower box bounds represent 25th and 75th percentiles. The whisker lines represent the minimum and maximum values.

SUMMARY OF CLINICAL RESULTS

- BMN 270 was Well-Tolerated with Favorable Safety Profile; Currently:
 - No subjects in either cohort have FVIII activity levels above the upper limit of normal
 - ALT levels within normal limits in all subjects
 - All subjects remain off corticosteroids
 - No inhibitors to FVIII
 - Only 2 serious adverse events as previously reported
- Annualize Bleeding Rate: Profound Reduction with Both Cohorts
 - 6e13 vg/kg sustained 2 years, 4e13 vg/kg sustained 1 year and counting
- FVIII Usage: Profound Reduction with Both 6e13 and 4e13 vg/kg Cohorts
- Quality of Life Improvement in Six Domains Reflects:
 - Cessation of Bleeding, Freedom From Worry, Independence From Treatment and Improved Functioning
- FVIII Activity Levels
 - 6e13 vg/kg cohort, settling within normal range
 - 4e13 vg/kg cohort, at upper range of mild hemophilia
- Patterns of FVIII Activity Levels Consistent with Other Clinical and Pre-Clinical Reports
- Gene Therapy Has the Potential to Transform the Standard of Care in Hemophilia A

NEXT STEPS

- New goal is to prove superiority of BMN 270 to prophylactic therapy
- GENEr8-1 (6e13 vg/kg) sample size now powered for superiority
 - 90% power to demonstrate reduction in bleeding events from ABR of 3.5 to 1.0
 - N = 130 (90 additional patients)
 - Expect to complete enrollment in Q1 2019
- GENEr8-2 (4e13 vg/kg) study design unchanged
 - N = 40
 - FVIII primary endpoint
 - Targeted to finish enrollment 1-2 quarters after GENEr8-1
- Comprehensive program underway
 - AAV5+ study initiated
 - Global seroprevalance study
 - Ongoing follow-up of 201 patients
 - Initiating use of full commercial scale material from BioMarin manufacturing facility

Process Comparability: Factors That Can Impact Potency

• Capsid Protein Content

• Deamidation of Capsid Proteins

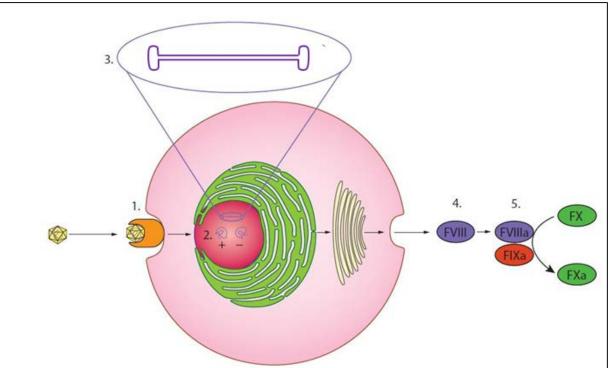
• Presence of Empty Capsids

Potency Assay Overview

- Method Details
 - Cell-based assay confirms mechanism of action and enables monitoring of consistency and comparability between processes
 - Relies on vg titer to determine assay loading
 - Readout is a Potency Ratio (test sample read-out normalized to reference standard read-out).
 - Potency is assessed via measurement of FVIII activity and protein levels (separate potency ratios for both)

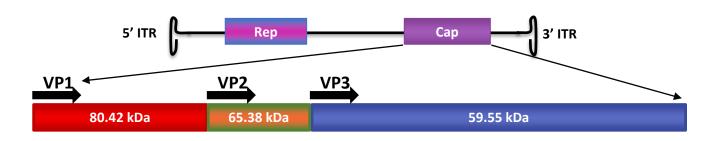
What is Biologically Required to Demonstrate Potency?

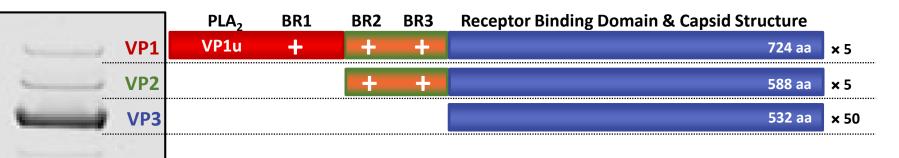
- 1. Effectively enter the cell
 - a) Available Receptors
 - b) Functional Capsid
- 2. Traffic DNA to the Nucleus
- 3. Forms complete Double Stranded DNA
- 4. FVIII Efficiently Expressed and Secreted (ELISA)
- 5. FVIII Activity (Chromogenic Assay)
 - a) Requires effective expression, correct folding and postranslational modifications

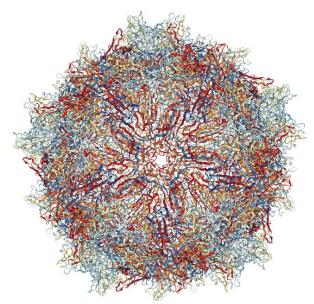


SDS-PAGE on AAV5

STRUCTURAL ASSEMBLY OF AAV5 CAPSID







AAV5 Crystal Structure

Structural Insights into Adeno-Associated Virus Serotype 5 Govindaswamy et.al (2013) J.Virol. 87: 11187-11199

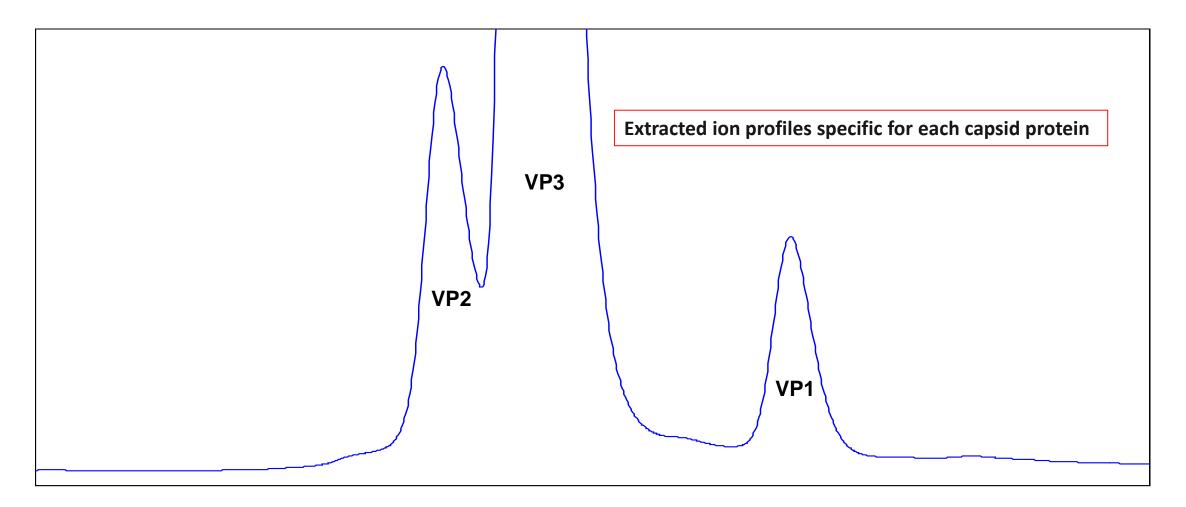
Functional Role of Different Viral Proteins (VP) Constituents :

- Phospholipase A₂ (PLA₂): Membrane Disruption of Endosome (VP1)
- Basic Region (BR): Putative Nuclear Localization Signals (VP1, VP2)
- Receptor Binding Domain: Capsid Interaction with Cell Surface Receptors (VP1, VP2 & VP3)
- Capsid Assembly: Icosahedral Structure (VP1, VP2 & VP3)

Mutagenesis of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Protein VP1 Uncovers New Roles for Basic Amino Acids in Trafficking and Cell-Specific Transduction Johnson et.al (2010) J.Virol. 84: 8888-8902

Impact of VP1-Specific Protein Sequence Motifs on Adeno-Associated Virus Type 2 Intracellular Trafficking and Nuclear Entry Popa-Wagner (2012) J.Virol. 86: 9163-9174

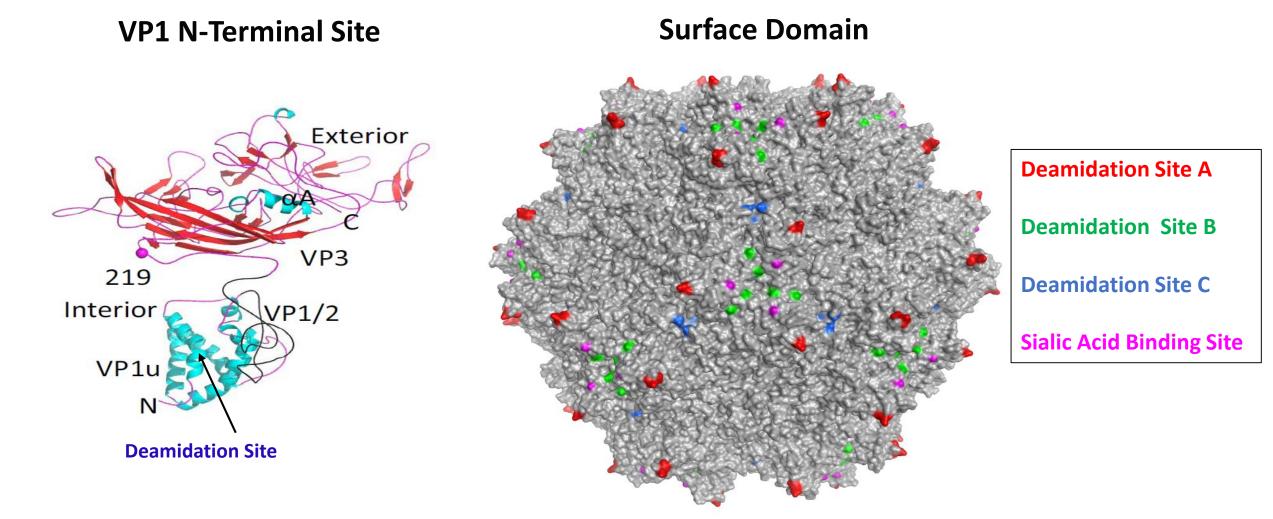
SEPARATING CAPSID PROTEINS BY REVERSED PHASE HPLC & MONITORING BY MASS SPECTROMETRY



Viral capsid proteins are detected using UV wavelength 214 and identified using mass spec analysis.

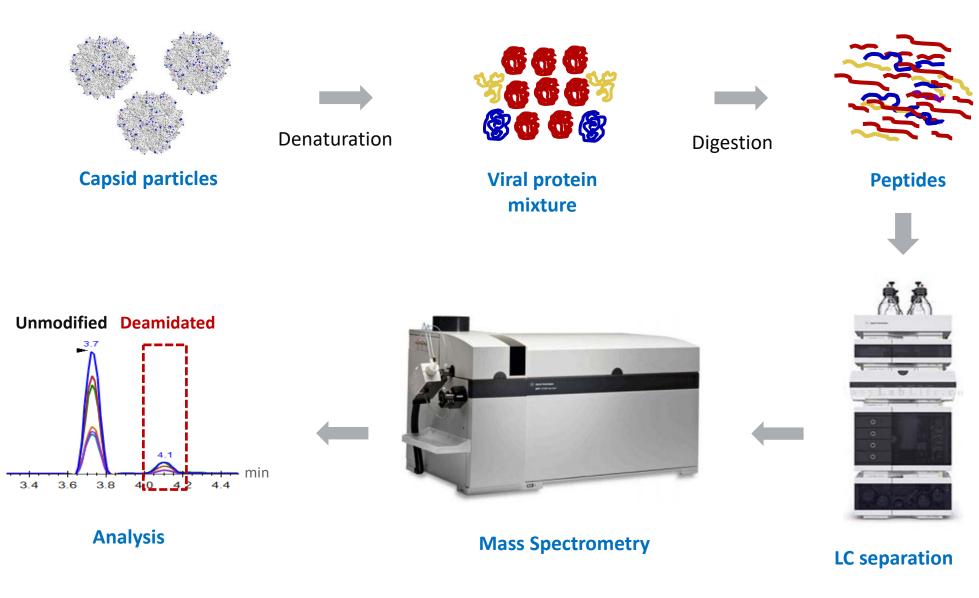
16

CAPSID DEAMIDATION SITES

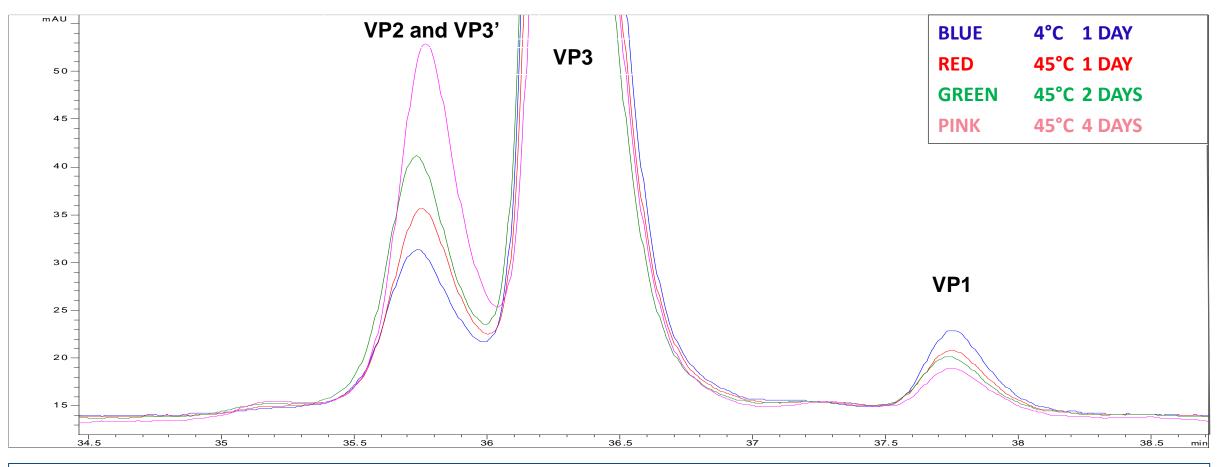


Structure and Dynamics of Adeno-Associated Virus Serotype 1 VP1-Unique N-Terminal Domain and Its Role in Capsid Trafficking Venkatakrishnan et al J. Virology (2013) 87(24):13150-60.

DEAMIDATION ANALYSIS BY LC/MS



DETECTION OF DEAMIDATION REVERSED PHASE HPLC & MONITORING BY MASS SPECTROMETRY



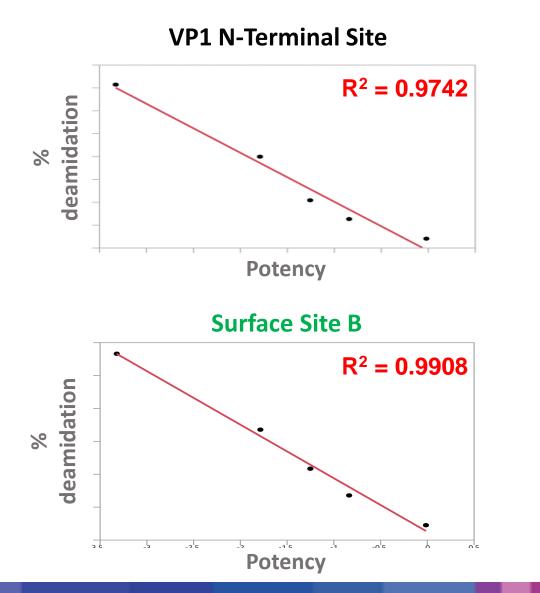
Thermal degradation results in deamidation of the capsid virus proteins

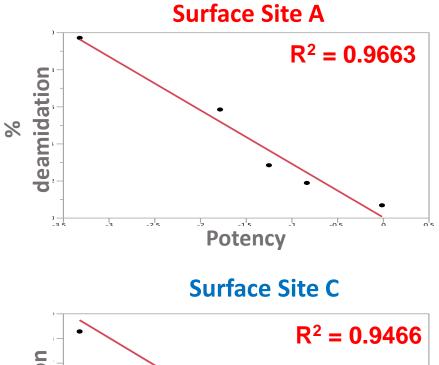
In the RP-HPLC, deamidation results in the decrease of VP1 and VP3 peak areas and an increase of VP2 apparent peak area

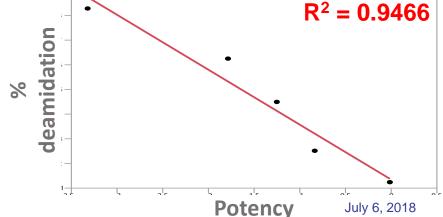
It has been determined by various MS methods that deamidated VP3 species (shown here as VP3') co-eludes with VP2

19

CORRELATION BETWEEN SITE SPECIFIC DEAMIDATION AND IN VITRO POTENCY

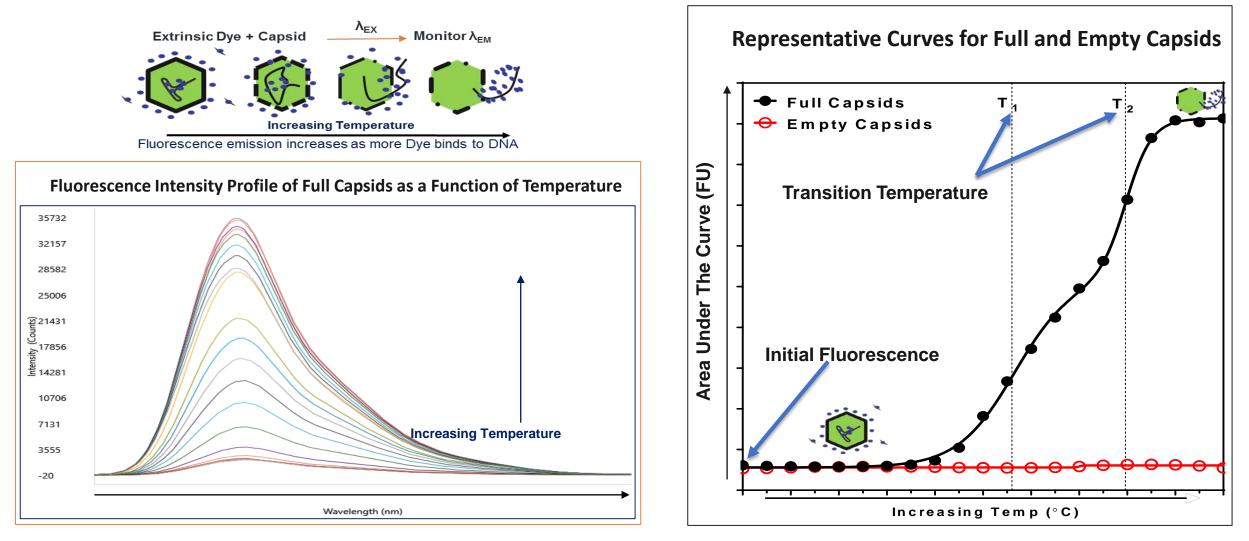






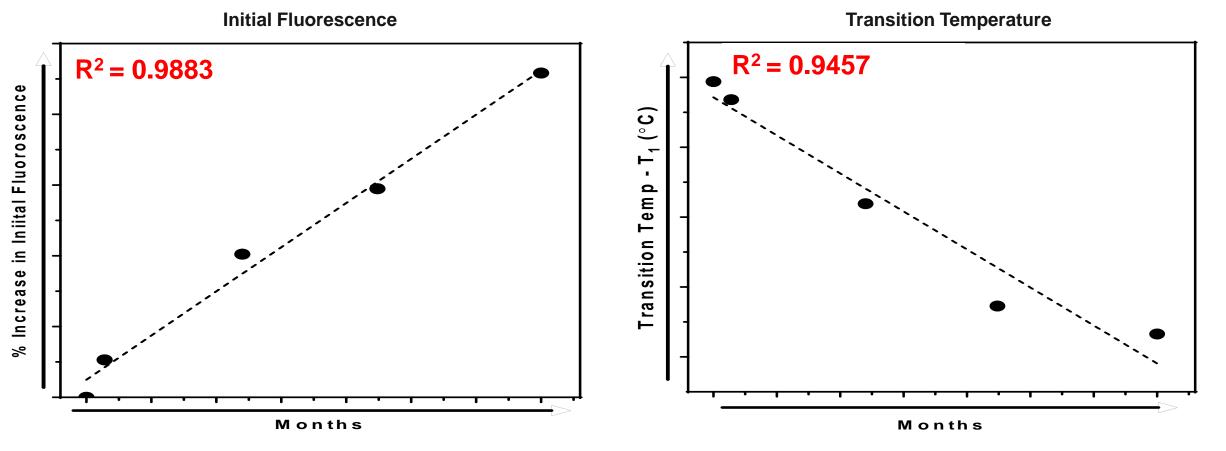
20

CAPSID INTEGRITY ANALYSIS USING FLUORESCENCE SPECTROSCOPY



Transition Temperature Inflections Detected By Fluorescence Emission Increases Are Indicative of Capsid Instability

CAPSID STABILITY ANALYSIS AND CORRELATION WITH DEAMIDATION AND POTENCY

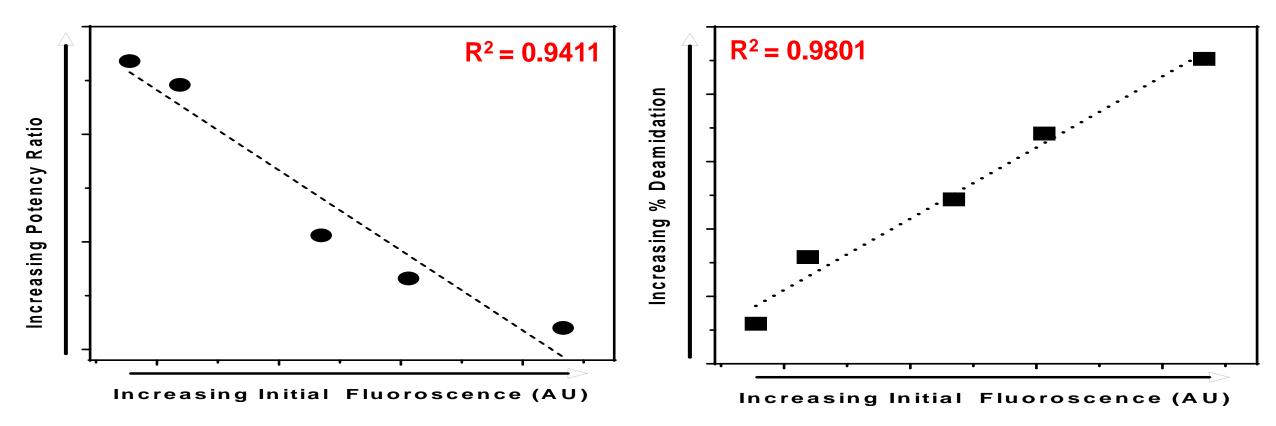


Initial Fluorescence and Transition Temperature

Change Over Time

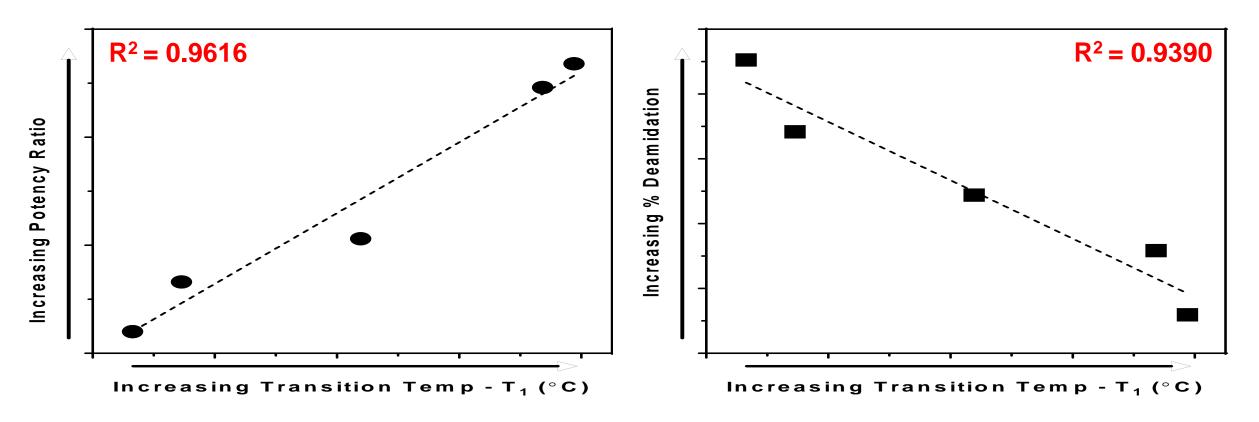
Consistent With Capsid Instability

CAPSID STABILITY ANALYSIS AND CORRELATION WITH DEAMIDATION AND POTENCY



Initial Fluorescence Change is Correlated with % Deamidation Increase and Potency Decrease of Capsid Vectors

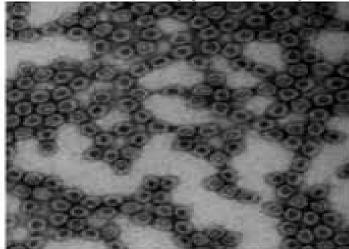
CAPSID STABILITY ANALYSIS AND CORRELATION WITH DEAMIDATION AND POTENCY



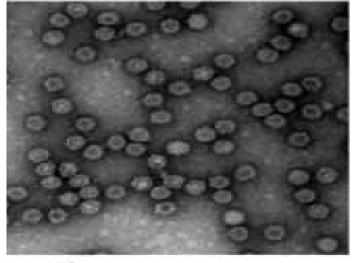
Transition Temperature Change is Correlated with % Deamidation Increase and Potency Decrease of Capsid Vectors

BIOMARIN PROCESS IS ABLE TO REMOVE EMPTY CAPSIDS TO UNDETECTABLE LEVELS

Electron Microscopy of Full Capsids



Electron Microscopy of Empty Capsids

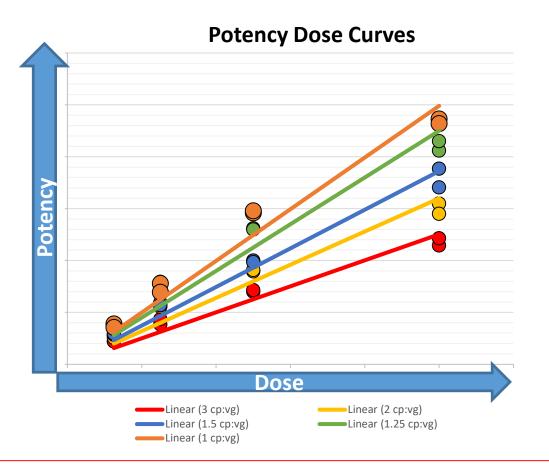


FULL CAPSIDS Relative Amount **EMPTY CAPSIDS** ND Step 1 Step 2 Step 3

Removal of Empty Capsids from Type 1 Adeno-Associated Virus Vector Stocks by Anion-Exchange Chromatography Potentiates Transgene Expression, Masashi et al., Molecular Therapy, Volume 13, Issue 4, April 2006, Pages 823-828

BioMarin Phase 3/Commercial Process

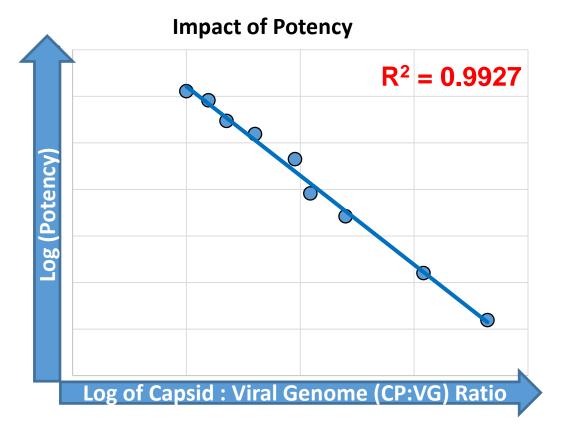
CAPSID TO VIRAL GENOME CONCENTRATION NEGATIVELY IMPACTS POTENCY



Empty capsids mixed with Full capsids to generate material with increasing [CP:VG]

Cells were transduced with the same concentration of VG/cell regardless of CP:VG ratio

Empty Capsid Results in Reduce Potency Even at a Constant Viral Genome



Log transformed potency value exhibit a negative association with log transformed [CP:VG]

CP:VG ratios between 1 and 21 shown in graph above

SUMMARY OF COMPARABILITY APPROACH

- Biomimetic Cell Based Assays Most Appropriate for Measurement of Potency in Such a Complex Product
 - Cell Based Assays Monitors For:
 - Binding to the Cellular Receptor
 - Internalization of the Vector in to the Cell
 - Release and Translocation of the Transgene to the Nuclease (Nucleolus)
 - Expression of Functional Factor VIII as a Clinically Meaningful Readout
- Capsid Protein Content and Potency Assays Used to Monitor Comparability During
 - First In-Human Study
 - Process Robustness Initiatives
 - Facility & Scale Modifications
- Deamidation of Capsid Proteins
 - Strong Negative Correlation Between Deamidation and Potency
- Empty Capsid Content
 - Strong Negative Correlation Between Empty Capsid Content and Potency
 - Empty Capsid Results in Reduce Potency Even at a Constant Viral Genome Level

ELEMENTS AND BENEFITS OF A COMPREHENSIVE COMPARABILITY STRATEGY HAVE INCLUDED

PROCESS DEVELOPMENT

- We Have Developed a Robust Vector Manufacturing Process Consistent With ICH Guidance Facilitating World Wide Registration

ANALYTICAL CHARACTERIZATION

- We Have Developed a Battery of Biochemical, Cell Based and Animal Based Methods Consistent With ICH Guidance
- These Methods Provide Comprehensive Characterization of Purity, Potency, Consistency and Comparability

SCALE

- Fermentation, Purification & Filling Operations Performed at Commercial Scale Demonstrating Comparability

FACILITY

- Constructed, Commissioned and GMP Operational to Support Intended Commercial Production
- Recognized as ISPE 2018 Facility of the Year Project Execution Category
- Material Generated Currently Supporting Clinical Development and Capable of Supporting Projected Commercial Demand
- Capable of Supporting at Least 3,000 Patients Per Year at the Highest Clinical Dose Tested to Date



THANK YOU

