REMBAC

REMBAC - A Rapid Efficient Manifold Baculovirus Transduction Platform for stable cell line development

Programm / Ausschreibung	Spin-off Fellowship, 2. AS Spin Off Fellowship 2022-2027	**Status**	laufend
Projektstart	01.01.2025	**Projektende**	30.04.2027
Zeitraum	2025 - 2027	**Projektlaufzeit**	28 Monate
Keywords	baculovirus; cell line engineering; recombinant protein production; Antigen-specific reporter cell line generation; high-efficiency transduction; elevated space-time yield		

Projektbeschreibung

Die Herstellung komplexer Produkte, wie virusähnliche Partikel (VLPs, Impfstoffe) und Adeno-assoziierte Viren (AAVs, Gentherapie), erfordert stabile Zelllinien. Konventionelle Transfektionsmethoden sind oft ineffizient und führen zu inkonsistenter Produktqualität. Stabile Zelllinien sind daher unerlässlich, jedoch ist ihre Entwicklung zeitaufwendig, besonders bei jenen, die über mehrere Expressionkassetten integrieren sollen. Aktuelle Lösungen, basierend auf Zellen des chinesischen Hamsters, erfüllen oft nicht die Qualitätsanforderungen für VLPs und AAVs, was den Bedarf an einer vielseitigen, zelltypunabhängigen Plattform für stabile Zelllinienentwicklung unterstreicht.
Unsere Lösung basiert auf der Baculovirus-Transduktion von Säugerzellen (BacMam), die kosteneffizient, skalierbar und effektiv ist. BacMam bietet wesentliche Vorteile: Es benötigt keine Hochsicherheitslabore, transduziert effizient verschiedene Zelltypen und integriert große DNA-Fragmente ins Genom. Mit der REMBAC-Plattform (Rapid Efficient Manifold Baculovirus Transduction) ermöglichen wir eine gezielte Integration großer Transgene bei modularer Expression. Insulatoren schützen die Expressionskassette vor der Stummschaltung durch die Wirtszelle.
REMBAC vereinfacht die Entwicklung stabiler Zelllinien für diverse biopharmazeutische Anwendungen, wie die VLP-Impfstoffproduktion, AAV-Gentherapie-Vektoren und monoklonale Antikörper. Es ermöglicht eine effiziente Genübertragung in verschiedene Zelltypen und integriert Transgene ohne virale Rückstände. REMBAC kombiniert die Vorteile von BacMam mit homologer Rekombination zur gezielten Integration und der I-SceI-Endonuklease für präzise Transgen-Exzision. Eine Transfervektor-Bibliothek unterstützt die langanhaltende und fein abgestimmte Expression, die besonders bei zelltoxischen Proteinen wichtig ist.
In diesem Projekt werden wir (i)die Integration in HEK293- und HeLa-Zellen durch Anpassung der Homologie-Regionen optimieren, (ii)einen neuen „Genomic Safe Harbor“ für HeLa-Zellen identifizieren und (iii)die Transkriptionsprofile unserer Expressionsplasmide charakterisieren. Der Fokus liegt auf der genotypischen und phänotypischen Charakterisierung stabiler Zellklone. Wir testen die korrekte Integration der Transgene, die Kopienzahl, Mutationen, Baculovirus-Reste und die langfristige Stabilität der Kassette. Darüber hinaus vergleichen wir das Wachstum und die Morphologie der stabilen Klone mit Wildtyp-Zellen.
Als Proof-of-Principle werden wir REMBAC-basierte Zelllinien, die Influenza-A-VLPs oder Trastuzumab exprimieren, mit plasmidbasierten Methoden vergleichen. Wir erwarten, dass REMBAC Vorteile hinsichtlich Ausbeute, Effizienz und Konsistenz

bietet und sein Potenzial in verschiedenen biotechnologischen Anwendungen demonstriert.
Weiters planen wir die Erzeugung stabiler, antigen-spezifischer Reporterzelllinien durch zufällige Genomintegration. Diese Zelllinien sollen in der Medikamentenentwicklung und Impfstoffherstellung zur Quantifizierung und Potenzprüfung von Impfstoffkandidaten eingesetzt werden.
Zusammenfassend zielt dieses Projekt darauf ab, die Effizienz und Vielseitigkeit des REMBAC-Systems zu validieren, homologe Rekombinationssequenzen zu optimieren und neue „Genomic Safe Harbors“ zu identifizieren. Zudem soll die Überlegenheit von REMBAC gegenüber herkömmlichen Methoden in Bezug auf Effizienz und Produktqualität demonstriert und stabile Reporterzelllinien für die biopharmazeutische Industrie bereitgestellt werden.

Abstract

Efficient recombinant protein production depends on stable cell lines, especially for complex products like virus-like particles (VLPs) and adeno-associated viruses (AAVs) used in vaccines and gene therapy their use is aspirated. Conventional transfection methods often lead to inefficiencies and inconsistent product quality, making stable cell lines essential. However, developing these lines, particularly for large transgenes, is time-consuming and challenging. Current solutions, typically using Chinese hamster ovary (CHO) cells, may not meet the quality demands of VLPs and AAVs, which require human-like glycosylation. Therefore, a versatile, cell type-independent platform for stable cell line development is needed. Our system, based on baculoviral transduction of mammalian cells (BacMam), addresses this need. BacMam is cost-effective, scalable, and efficient, with key advantages: it doesn’t require high-biosafety labs, transduces various cell types, and integrates large DNA fragments into genomes. We developed the REMBAC platform (Rapid Efficient Manifold Baculovirus Transduction), enabling site-specific integration of large transgenes with customizable expression. This is particularly useful for cell-toxic proteins, and the system includes insulators to protect against host-cell silencing.
REMBAC facilitates stable cell line development (SCLD) for a variety of biopharmaceutical applications, including VLP vaccines, AAV gene therapy vectors, and monoclonal antibodies. It combines BacMam’s versatility with homologous recombination for site-specific integration and uses the I-SceI homing endonuclease for precise transgene excision. A library of transfer vectors supports long-term, fine-tuned protein expression.
This project aims to (i) optimize integration for model cell lines (HEK293 and HeLa) by adjusting homology region lengths, (ii) identify a genomic safe harbor (GSH) for HeLa cells, and (iii) characterize the transcriptional profiles of our plasmid toolbox. A major focus will be on genotypic and phenotypic characterization, verifying transgene integration, assessing copy number, checking for mutations or residual baculovirus sequences, and ensuring long-term cassette stability. We will also compare the growth and morphology of modified cells to wild-type cells to ensure the process does not negatively impact cell health. As proof of concept, we will compare REMBAC-based stable cell lines with conventional plasmid-based methods for producing influenza A VLPs and the therapeutic antibody Trastuzumab. We expect REMBAC to improve yield, consistency, and production time, demonstrating its broad potential for various biotechnological applications.
Additionally, we plan to generate stable antigen-specific reporter cell lines using random genome integration. These reporter lines will simplify production by allowing easy identification and quantification of expression products and supporting potency testing during early production and clinical stages.
In summary, this project aims to validate the REMBAC system’s efficiency and versatility for stable cell line development, optimize key components like homologous recombination sequences, and explore new genomic safe harbors. We aim to demonstrate REMBAC’s superiority over conventional methods in terms of efficiency and product quality while also providing valuable tools, such as stable reporter cell lines, for the biopharmaceutical industry.

Projektpartner

- Universität für Bodenkultur Wien Institut für Molekulare Biotechnologie