

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Dezember 2002 (12.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/098443 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 38/00 (72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/06180 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOERR, Ingmar [DE/DE]; Hagellocherweg 40, 72070 Tübingen (DE). PASCOLO, Steve [FR/DE]; Bursagasse 12, 72070 Tübingen (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Juni 2002 (05.06.2002)
(25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwälte: VON GRAF STOSCH, Andreas usw.; Bosch, Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstr. 8, 80333 München (DE).
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität: 101 27 283.9 5. Juni 2001 (05.06.2001) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
(71) Anmelder und
(72) Erfinder: VON DER MÜLBE, Florian [DE/DE]; Wanneweilerstr. 31/2, 72138 Kirchentellinsfurt (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING A STABILISED MRNA WHICH IS OPTIMISED FOR TRANSLATION IN THE CODING REGIONS THEREOF

(54) Bezeichnung: PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG, ENTHALTEND EINE STABILISIERTE UND FÜR DIE TRANSLATION IN IHREN CODIERENDEN BEREICHEN OPTIMIERTE mRNA

Influenza-Matrix: für sekretierte Form codierende mRNA mit erhöhtem G/C-Gehalt und Stabilisierungssequenzen

FLU MATRIX: mRNA CODING FOR THE SECRETED FROM AND HAVING AN INCREASED G/C CONTENT AND STABILISATION SEQUENCES

```
GCUUGUUCUUUUUGCAGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCagauc
uaaagaugGCCGUCUAUGGCCCCCGCACCCUGGUGCUGCUGAGCGGC
GCCUGGCCUGACCCAGACCUGGGCCagCcuGcuGaccgagguGgaGac
CuacguGcuGAGCaucaucccCAGCggcccccGaaGgcccagagcgcCc
agagGcuGgaGgaCguGuuCgcCggCaagaacaccgaCcuGgagguGcuG
auggaGuggcuGaagacCagGccCauccugAGCccCcuGacCaagggCau
CCUGggCuuCguguuacCcuGaccgugcccagCgagcgCggCcuGcagc
gCCGCcgcuuCguGcaGaaCgcccGaaCggCaaCggCgaCccCaaCaac
auggacaaGgcCguGaaGcuGuaCaggaagcuGaaaggggagauCacCuu
ccaCggCgcccGgaGaucAGCcuGagCuaCAGCgcCggCgcCcuGgcca
gCugCaugggccuGauCuacaacaggauugggCgcCgugaccacCgaGgug
gcCuuCggccugguGugCgcCaccugCgaGcagauCgcCgacAGCagca
CcgCAGCcaCaggcaGauggugacCacCaccaaccccCcuGaucagGcaCg
agaacagGaugguGCUgGccagcacCacCgcCaaggcCauggagcaGaug
gcCggCAGCaGcGagcaGgcCgcCgaggcccauggagguGgcCagCaggc
CaggcaGauggugcaGgcCaugagGaccuacCggCacCcaCccCagcAGCa
gCgcCggCcuGaaGaaCgaCcuGcuGgaGaaCCUGcaggccuaCagaaG
cgCaugggCgugcagaugcaGcgCucaagugaACUAGUGACUGACUAGC
CCGUGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCUCCUCCUUGCACCACAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA
```

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical composition containing an mRNA which is stabilised by sequence modifications in the translated region and is optimised for the translation. The inventive pharmaceutical composition is especially suitable as a vaccine and as a therapeutic agent for tissue repair. The invention also relates to a method for determining sequence modifications used to stabilise mRNA and to optimise the translation of the same.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/098443 A2



SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine mRNA, die durch Sequenzmodifikationen im translatierten Bereich stabilisiert und für die Translation optimiert ist. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung eignet sich insbesondere als Impfstoff sowie als Therapeutikum zur Geweberegeneration. Des weiteren wird ein Verfahren zur Ermittlung von Sequenzmodifikationen, die der Stabilisierung und Translationsoptimierung von mRNA dienen, offenbart.

5

10 **Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine stabilisierte und für die Translation in ihren codierenden Bereichen optimierte mRNA**

15

Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine mRNA, die durch Sequenzmodifikationen im translatierten Bereich stabilisiert und für die Translation optimiert ist. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung eignet sich insbesondere als Impfstoff sowie als Therapeutikum zur Geweberegeneration. Des weiteren wird ein Verfahren zur Ermittlung von Sequenzmodifikationen, die der Stabilisierung und Translationsoptimierung von mRNA dienen, offenbart.

20

Die Gentherapie und die genetische Vakzinierung sind molekularmedizinische Verfahren, deren Anwendung in der Therapie und Prävention von Erkrankungen erhebliche Auswirkungen auf die medizinische Praxis haben wird. Beide Verfahren beruhen auf der Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen bzw. in Gewebe des Patienten sowie auf der anschließenden Verarbeitung der durch die eingebrachten Nukleinsäuren codierten Information, d.h. der Expression der erwünschten Polypeptide.

25

Die übliche Vorgehensweise bisheriger Verfahren der Gentherapie und der genetischen Vakzinierung ist die Verwendung von DNA, um die benötigte genetische Information in die Zelle einzuschleusen. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Verfahren zur Einbringung von DNA in Zellen, wie bspw. Calciumphosphat-Transfektion, Polypren-Transfektion, Protoplasten-Fusion, Elektroporation, Mikroinjektion und Lipofektion, entwickelt worden, wobei sich insbesondere die Lipofektion als geeignetes Verfahren herausgestellt hat.

30

35

wickelt worden, wobei sich insbesondere die Lipofektion als geeignetes Verfahren herausgestellt hat.

Ein weiteres Verfahren, das insbesondere bei genetischen Vakzinierungsverfahren vorgeschlagen wurde, ist die Verwendung von DNA-Viren als DNA-Vehikel. Derartige Viren haben den Vorteil, daß aufgrund ihrer infektiösen Eigenschaften eine sehr hohe Transfektionsrate zu erzielen ist. Die verwendeten Viren werden genetisch verändert, so daß in der transfizierten Zelle keine funktionsfähigen infektiösen Partikel gebildet werden. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahme kann jedoch aufgrund möglicher Rekombinationsereignisse ein gewisses Risiko der unkontrollierten Ausbreitung der eingebrachten gentherapeutisch wirksamen sowie viralen Gene nicht ausgeschlossen werden.

Üblicherweise wird die in die Zelle eingebrachte DNA in gewissem Ausmaß in das Genom der transfizierten Zelle integriert. Einerseits kann dieses Phänomen einen erwünschten Effekt ausüben, da hierdurch eine langandauernde Wirkung der eingebrachten DNA erzielt werden kann. Andererseits bringt die Integration in das Genom ein wesentliches Risiko der Gentherapie mit sich. So kann es bspw. zu einer Insertion der eingebrachten DNA in ein intaktes Gen kommen, was eine Mutation darstellt, welche die Funktion des endogenen Gens behindert oder gar vollkommen ausschaltet. Durch solche Integrationsereignisse können einerseits für die Zelle lebenswichtige Enzymsysteme ausgeschaltet werden, andererseits besteht auch die Gefahr einer Transformation der so veränderten Zelle in einen entarteten Zustand, falls durch die Integration der Fremd-DNA ein für die Regulation des Zellwachstums entscheidendes Gen verändert wird. Daher kann bei der Verwendung von DNA-Viren als Gentherapeutika und Vakzine ein Risiko der Krebsbildung nicht ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, daß zur wirksamen Expression der in die Zelle eingebrachten Gene die entsprechenden DNA-Vehikel einen starken Promotor, bspw. den viralen CMV-Promotor, enthalten. Die Integration derartiger Promotoren in das Genom der behandelten Zelle kann zu unerwünschten Veränderungen der Regulierung der Genexpression in der Zelle führen.

Ein weiterer Nachteil der Verwendung von DNA als Gentherapeutika und Vakzine ist die Induktion pathogener Anti-DNA-Antikörper im Patienten unter Hervorrufung einer möglicherweise tödlichen Immunantwort.

- 5 Im Gegensatz zu DNA ist der Einsatz von RNA als Gentherapeutikum oder Vakzin als wesentlich sicherer einzustufen. Insbesondere bringt RNA nicht die Gefahr mit sich, stabil in das Genom der transfizierten Zelle integriert zu werden. Des weiteren sind keine viralen Sequenzen, wie Promotoren, zur wirksamen Transkription, erforderlich. Darüber hinaus wird RNA wesentlich einfacher *in vivo* abgebaut. Wohl aufgrund der gegenüber DNA
- 10 relativ kurzen Halbwertszeit von RNA im Blutkreislauf sind bisher keine anti-RNA-Antikörper nachgewiesen worden. Daher kann RNA für molekularmedizinische Therapieverfahren als Molekül der Wahl angesehen werden.

- Allerdings bedürfen auf RNA-Expressionssystemen beruhende medizinische Verfahren
- 15 vor einer breiteren Anwendung noch der Lösung einiger grundsätzlicher Probleme. Eines der Probleme bei der Verwendung von RNA ist der sichere, Zell- bzw. Gewebespezifische effiziente Transfer der Nukleinsäure. Da sich RNA in Lösung normalerweise als sehr instabil erweist, konnte durch die herkömmlichen Verfahren, die bei DNA verwendet werden, RNA bisher nicht oder nur sehr ineffizient als Therapeutikum bzw. Impfstoff verwendet werden.
- 20

- Für die Instabilität sind RNA-abbauende Enzyme, sog. RNAasen (Ribonucleasen), verantwortlich. Selbst kleinste Verunreinigungen von Ribonucleasen reichen aus, um RNA in Lösung vollständig abzubauen. Der natürliche Abbau von mRNA im Cytoplasma von Zellen ist sehr fein reguliert. Diesbezüglich sind mehrere Mechanismen bekannt. So ist für
- 25 eine funktionale mRNA die endständige Struktur von entscheidender Bedeutung. Am 5'-Ende befindet sich die sogenannte "Cap-Struktur" (ein modifiziertes Guanosin-Nucleotid) und am 3'-Ende eine Abfolge von bis zu 200 Adenosin-Nucleotiden (der sog. Poly-A-Schwanz). Über diese Strukturen wird die RNA als mRNA erkannt und der Abbau reguliert. Darüber hinaus gibt es weitere Prozesse, die RNA stabilisieren bzw. destabilisieren. Viele diese Prozesse sind noch unbekannt, oftmals scheint jedoch eine Wechselwirkung
- 30 zwischen der RNA und Proteinen dafür maßgeblich zu sein. Bspw. wurde kürzlich ein

"mRNA-Surveillance-System" beschrieben (Hellerin und Parker, Annu. Rev. Genet. 1999, 33: 229 bis 260), bei dem durch bestimmte Feedback-Protein-Wechselwirkungen im Cytosol unvollständige oder Nonsense-mRNA erkannt und dem Abbau zugänglich gemacht wird, wobei ein Hauptteil dieser Prozesse durch Exonucleasen vollzogen wird.

5

Im Stand der Technik sind einige Maßnahmen vorgeschlagen worden, um die Stabilität von RNA zu erhöhen und dadurch ihren Einsatz als Gentherapeutikum bzw. RNA-Vakzine zu ermöglichen.

10 In EP-A-1083232 wird zur Lösung des vorstehend genannten Problems der Instabilität von RNA *ex vivo* ein Verfahren zur Einbringung von RNA, insbesondere mRNA, in Zellen und Organismen vorgeschlagen, bei welchem die RNA in Form eines Komplexes mit einem kationischen Peptid oder Protein vorliegt.

15 WO 99/14346 beschreibt weitere Verfahren zur Stabilisierung von mRNA. Insbesondere werden Modifizierungen der mRNA vorgeschlagen, welche die mRNA-Spezies gegenüber dem Abbau von RNasen stabilisieren. Derartige Modifikationen betreffen einerseits die Stabilisierung durch Sequenzmodifikationen, insbesondere Verminderung des C- und/oder U-Gehalts durch Baseneliminierung oder Basensubstitution. Andererseits werden
20 chemische Modifikationen, insbesondere die Verwendung von Nucleotidanaloga, sowie 5'- und 3'- Blockierungsgruppen, eine erhöhte Länge des Poly-A-Schwanzes sowie die Komplexierung der mRNA mit stabilisierenden Mitteln und Kombinationen der genannten Maßnahmen vorgeschlagen.

25 In den US-Patenten US 5,580,859 und US 6,214,804 werden unter anderem im Rahmen der "transienten Gentherapie" (TGT) mRNA-Vakzine und -Therapeutika offenbart. Es werden verschiedene Maßnahmen zur Erhöhung der Translationseffizienz und der mRNA-Stabilität beschrieben, die sich vor allem auf die nicht-translatierten Sequenzbereiche beziehen.

30

Bieler und Wagner (in: Schleef (Hrsg.), Plasmids for Therapy and Vaccination, Kapitel 9, Seiten 147 bis 168, Wiley-VCH, Weinheim, 2001) berichten von der Verwendung synthe-

tischer Gene im Zusammenhang mit gentherapeutischen Methoden unter Verwendung von DNA-Vakzinen und lentiviralen Vektoren. Es wird die Konstruktion eines synthetischen, von HIV-1 abgeleiteten *gag*-Gens beschrieben, bei welchem die Codons gegenüber der Wildtyp-Sequenz derart modifiziert wurden (alternative Codonverwendung, engl. "codon usage"), daß sie der Verwendung von Codons entsprach, die in hoch exprimierten Säuger-
5 genen zu finden ist. Dadurch wurde insbesondere der A/T-Gehalt gegenüber der Wildtyp-Sequenz vermindert. Die Autoren stellen insbesondere eine erhöhte Expressionsrate des synthetischen *gag*-Gens in transfizierten Zellen fest. Des weiteren wurde in Mäusen eine erhöhte Antikörperbildung gegen das *gag*-Protein bei mit dem synthetischen DNA-
10 Konstrukt immunisierten Mäusen und auch eine verstärkte Cytokinfreisetzung *in vitro* bei transfizierten Milzzellen von Mäusen beobachtet. Schließlich konnte eine Induzierung einer cytotoxischen Immunantwort in mit dem *gag*-Expressionsplasmid immunisierten Mäusen festgestellt werden. Die Autoren dieses Artikels führen die verbesserten Eigenschaften ihres DNA-Vakzins im wesentlichen auf einen durch die optimierte Codonver-
15 wendung hervorgerufene Veränderung des nucleo-cytoplasmatischen Transports der vom DNA-Vakzin exprimierten mRNA zurück. Im Gegensatz dazu halten die Autoren die Auswirkung der veränderten Codonverwendung auf die Translationseffizienz für gering.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein neues System zur Gen-
20 therapie und genetischen Vakzinierung bereitzustellen, das die mit den Eigenschaften von DNA-Therapeutika und -Vakzinen verbundenen Nachteile überwindet und die Wirksamkeit von auf RNA-Spezies basierenden Therapeutika erhöht.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen
25 der vorliegenden Erfindung gelöst.

Insbesondere wird eine modifizierte mRNA sowie eine mindestens eine derartige modifi-
zierte mRNA in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder
Vehikel enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, wobei die modifi-
30 zierte mRNA für mindestens ein biologisch wirksames oder antigenes Peptid oder Poly-
peptid codiert, wobei die Sequenz der mRNA, insbesondere im für das mindestens eine

Peptid oder Polypeptid codierenden Bereich, gegenüber der Wildtyp-mRNA folgende Modifikationen aufweist, die entweder alternativ oder in Kombination vorliegen können.

5 Zum einen ist der G/C-Gehalt des für das Peptid oder Polypeptid codierenden Bereichs der modifizierten mRNA größer als der G/C-Gehalt des codierenden Bereichs der für das Peptid oder Polypeptid codierenden Wildtyp-mRNA, wobei die codierte Aminosäuresequenz gegenüber dem Wildtyp unverändert ist.

10 Diese Modifikation beruht auf der Tatsache, daß für eine effiziente Translation einer mRNA die Sequenzabfolge des zu translatierenden Bereichs der mRNA wesentlich ist. Dabei spielt die Zusammensetzung und die Abfolge der verschiedenen Nucleotide eine große Rolle. Insbesondere sind Sequenzen mit erhöhtem G(Guanosin)/C(Cytosin)-Gehalt stabiler als Sequenzen mit einem erhöhten A(Adenosin)/U(Uracil)-Gehalt. Daher werden erfindungsgemäß unter Beibehaltung der translatierten Aminosäureabfolge die Codons
15 gegenüber der Wildtyp-mRNA derart variiert, daß sie vermehrt G/C-Nucleotide beinhalten. Da mehrere Codons für ein und dieselbe Aminosäure codieren (Degeneration des genetischen Codes), können die für die Stabilität günstigsten Codons ermittelt werden (alternative Codonverwendung, engl. "codon usage").

20 In Abhängigkeit von der durch die modifizierte mRNA zu codierenden Aminosäure sind unterschiedliche Möglichkeiten zur Modifikation der mRNA-Sequenz gegenüber der Wildtyp-Sequenz möglich. Im Fall von Aminosäuren, die durch Codons codiert werden, die ausschließlich G- oder C- Nucleotide enthalten, ist keine Modifikation des Codons erforderlich. So erfordern die Codons für Pro (CCC oder CCG), Arg (CGC oder CGG),
25 Ala (GCC oder GCG) und Gly (GGC oder GGG) keine Veränderung, da kein A oder U vorhanden ist.

In folgenden Fällen werden die Codons, welche A-und/oder U-Nucleotide enthalten durch Substituieren anderer Codons, welche die gleichen Aminosäuren codieren, jedoch kein A
30 und/oder U enthalten, verändert. Beispiele sind:

Die Codons für Pro können von CCU oder CCA zu CCC oder CCG verändert werden;

die Codons für Arg können von CGU oder CGA oder AGA oder AGG zu CGC oder CGG verändert werden;

die Codons für Ala können von GCU oder GCA zu GCC oder GCG verändert werden;

die Codons für Gly können von GGU oder GGA zu GGC oder GGG verändert werden.

5

In anderen Fällen können A bzw. U-Nucleotide zwar nicht aus den Codons eliminiert werden, es ist jedoch möglich, den A- und U-Gehalt durch Verwendung von Codons zu vermindern, die weniger A- und/oder U-Nucleotide enthalten. Zum Beispiel:

Die Codons für Phe können von UUU zu UUC verändert werden;

10 die Codons für Leu können von UUA, CUU oder CUA zu CUC oder CUG verändert werden;

die Codons für Ser können von UCU oder UCA oder AGU zu UCC, UCG oder AGC verändert werden;

das Codon für Tyr kann von UAU zu UAC verändert werden;

15 das Stop-Codon UAA kann zu UAG oder UGA verändert werden;

das Codon für Cys kann von UGU zu UGC verändert werden;

das Codon His kann von CAU zu CAC verändert werden;

das Codon für Gln kann von CAA zu CAG verändert werden;

die Codons für Ile können von AUU oder AUA zu AUC verändert werden;

20 die Codons für Thr können von ACU oder ACA zu ACC oder ACG verändert werden;

das Codon für Asn kann von AAU zu AAC verändert werden;

das Codon für Lys kann von AAA zu AAG verändert werden;

die Codons für Val können von GUU oder GUA zu GUC oder GUG verändert werden;

das Codon für Asp kann von GAU zu GAC verändert werden;

25 das Codon für Glu kann von GAA zu GAG verändert werden.

Im Falle der Codons für Met (AUG) und Trp (UGG) besteht hingegen keine Möglichkeit der Sequenzmodifikation.

30 Die vorstehend aufgeführten Substitutionen können selbstverständlich einzeln aber auch in allen möglichen Kombinationen zur Erhöhung des G/C-Gehalts der modifizierten mRNA gegenüber der ursprünglichen Sequenz verwendet werden. So können beispielsweise alle

in der ursprünglichen (Wildtyp-) Sequenz auftretenden Codons für Thr zu ACC (oder ACG) verändert werden. Vorzugsweise werden jedoch Kombinationen der vorstehenden Substitutionsmöglichkeiten genutzt, z.B.:

5 Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Thr codierenden Codons zu ACC (oder ACG) und Substitution aller ursprünglich für Ser codierenden Codons zu UCC (oder UCG oder AGC);

Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Ile codierenden Codons zu AUC und Substitution aller ursprünglich für Lys codierenden Codons zu AAG und Substitution aller ursprünglich für Tyr codierenden Codons zu UAC;

10 Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val codierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Glu codierenden Codons zu GAG und Substitution aller ursprünglich für Ala codierenden Codons zu GCC (oder GCG) und Substitution aller ursprünglich für Arg codierenden Codons zu CGC (oder CGG);

15 Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val codierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Glu codierenden Codons zu GAG und Substitution aller ursprünglich für Ala codierenden Codons zu GCC (oder GCG) und Substitution aller ursprünglich für Gly codierenden Codons zu GGC (oder GGG) und Substitution aller ursprünglich für Asn codierenden Codons zu AAC;

20 Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val codierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Phe codierenden Codons zu UUC und Substitution aller ursprünglich für Cys codierenden Codons zu UGC und Substitution aller ursprünglich für Leu codierenden Codons zu CUG (oder CUC) und Substitution aller ursprünglich für Gln codierenden Codons zu CAG und Substitution aller ursprünglich für Pro codierenden Codons zu CCC (oder CCG);

25 usw.

Vorzugsweise wird der G/C-Gehalt des für das Peptid bzw. Polypeptid codierenden Bereichs der modifizierten mRNA um mindestens 7%-Punkte, mehr bevorzugt um mindestens 15%-Punkte, besonders bevorzugt um mindestens 20%-Punkte gegenüber dem G/C-Gehalt des codierten Bereichs der für das Polypeptid codierenden Wildtyp-mRNA erhöht.

30

Besonders bevorzugt ist es in diesem Zusammenhang, den G/C-Gehalt der modifizierten mRNA, insbesondere im für das mindestens eine Peptid bzw. Polypeptid codierenden Bereich, im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz maximal zu erhöhen.

- 5 Die weitere erfindungsgemäße Modifikation der in der vorliegenden Erfindung gekennzeichneten pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen mRNA beruht auf der Erkenntnis, daß die Translationseffizienz auch durch eine unterschiedliche Häufigkeit im Vorkommen von tRNAs in Zellen bestimmt wird. Sind daher in einer RNA-Sequenz vermehrt sogenannte "seltene" Codons vorhanden, so wird die entsprechende mRNA deutlich schlechter translatiert als in dem Fall, wenn für relativ "häufige" tRNAs codierende Codons vorhanden sind.

Somit wird erfindungsgemäß in der modifizierten mRNA (welche in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten ist), der für das Peptid bzw. Polypeptid codierende Bereich gegenüber dem entsprechenden Bereich der Wildtyp-mRNA derart verändert, daß
15 mindestens ein Codon der Wildtyp-Sequenz, das für eine in der Zelle relativ seltene tRNA codiert, gegen ein Codon ausgetauscht, das für eine in der Zelle relativ häufige tRNA codiert, welche die gleiche Aminosäure trägt wie die relativ seltene tRNA.

- 20 Durch diese Modifikation werden die RNA-Sequenzen derart modifiziert, daß Codons eingefügt werden, für die häufig vorkommende tRNAs zur Verfügung stehen.

Welche tRNAs relativ häufig in der Zelle vorkommen und welche demgegenüber relativ selten sind, ist einem Fachmann bekannt; vgl. bspw. Akashi, *Curr. Opin. Genet. Dev.*
25 2001, 11(6): 660-666.

Durch diese Modifikation können erfindungsgemäß alle Codons der Wildtyp-Sequenz, die für eine in der Zelle relativ seltene tRNA codieren, jeweils gegen ein Codon ausgetauscht werden, das für eine in der Zelle relativ häufige tRNA codiert, welche jeweils die gleiche
30 Aminosäure trägt wie die relativ seltene tRNA.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, den erfindungsgemäß in der modifizierten mRNA erhöhten, insbesondere maximalen, sequenziellen G/C-Anteil mit den "häufigen" Codons zu verknüpfen, ohne die Aminosäuresequenz des durch den codierenden Bereich der mRNA codierten Peptids bzw. Polypeptids (ein oder mehrere) zu verändern. Diese bevorzugte Ausführungsform stellt eine besonders effizient translatierte und stabilisierte mRNA bspw. für die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung bereit.

In den Sequenzen eukaryotischer mRNAs gibt es destabilisierende Sequenzelemente (DSE), an welche Signalproteine binden und den enzymatischen Abbau der mRNA *in vivo* regulieren. Daher werden zur weiteren Stabilisierung der in der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen modifizierten mRNA gegebenenfalls im für das mindestens eine Peptid bzw. Polypeptid codierenden Bereich ein oder mehrere Veränderungen gegenüber dem entsprechenden Bereich der Wildtyp-mRNA vorgenommen, so daß keine destabilisierenden Sequenzelemente enthalten sind. Selbstverständlich ist es erfindungsgemäß ebenfalls bevorzugt, gegebenenfalls in den nicht-translatierten Bereichen (3'- und/oder 5'-UTR) vorhandene DSE aus der mRNA zu eliminieren.

Derartige destabilisierende Sequenzen sind bspw. AU-reiche Sequenzen ("AURES"), die in 3'-UTR-Abschnitten zahlreicher instabiler mRNA vorkommen (Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670 bis 1674). Die in der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen RNA-Moleküle sind daher vorzugsweise derart gegenüber der Wildtyp-mRNA verändert, daß sie keine derartigen destabilisierenden Sequenzen aufweisen. Dies gilt auch für solche Sequenzmotive, die von möglichen Endonucleasen erkannt werden, bspw. die Sequenz GAACAAG, die im 3' UTR-Segment des für den Transferin-Rezeptor codierenden Gens enthalten ist (Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969 bis 1980). Auch diese Sequenzmotive werden bevorzugt in der modifizierten mRNA der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung eliminiert.

Einem Fachmann sind verschiedene Verfahren geläufig, die zur Substitution von Codons in der erfindungsgemäßen modifizierten mRNA geeignet sind. Im Falle kürzerer codierender Bereiche (die für biologisch wirksame oder antigene Peptide codieren) kann bspw.

die gesamte mRNA chemisch unter Verwendung von Standardtechniken synthetisiert werden.

5 Bevorzugt werden allerdings Basensubstitutionen unter Verwendung einer DNA-Matrize zur Herstellung der modifizierten mRNA mit Hilfe von Techniken der gängigen zielgerichteten Mutagenese eingeführt; Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl., Cold Spring Harbor, NY, 2001.

10 Bei diesem Verfahren wird zur Herstellung der mRNA daher ein entsprechendes DNA-Molekül *in vitro* transkribiert. Diese DNA-Matrize besitzt einen geeigneten Promotor, bspw. einen T7 -oder SP6-Promotor, für die *in vitro* Transkription, dem die gewünschte Nucleotidsequenz für die herzustellende mRNA und ein Terminationssignal für die *in vitro* Transkription folgen. Erfindungsgemäß wird das DNA-Molekül, das die Matrize des herzustellenden RNA-Konstrukts bildet, durch fermentative Vermehrung und anschließende Isolierung als Teil eines in Bakterien replizierbaren Plasmids hergestellt. Als für die
15 vorliegende Erfindung geeignete Plasmide können bspw. die Plasmide pT7Ts (GenBank-Zugriffsnummer U26404; Lai et al., *Development* 1995, 121: 2349 bis 2360), pGEM[®]-Reihe, bspw. pGEM[®]-1 (GenBank-Zugriffsnummer X65300; von Promega) und pSP64 (GenBank-Zugriffsnummer X65327) genannt werden; vgl. auch Mezei und Storts, *Purification of PCR Products*, in: Griffin und Griffin (Hrsg.), *PCR Technology: Current Innovation*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.
20

Es kann so unter Verwendung kurzer synthetischer DNA-Oligonucleotide, die an den entstehenden Schnittstellen kurze einzelsträngige Übergänge aufweisen, oder durch chemische Synthese hergestellte Gene die gewünschte Nucleotidsequenz nach einem Fachmann
25 geläufigen molekularbiologischen Methoden in ein geeignetes Plasmid cloniert werden (vgl. Maniatis et al., s.o.). Das DNA-Molekül wird dann aus dem Plasmid, in welchem es in einfacher oder mehrfacher Kopie vorliegen kann, durch Verdauung mit Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten.

30

Die modifizierte mRNA, welche in der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten ist, kann darüber hinaus eine 5'-Cap-Struktur (ein modifiziertes Guano-

sin-Nucleotid) aufweisen. Als Beispiele von Cap-Strukturen können m⁷G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A und G(5')ppp(5')G genannt werden.

5 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält die modifizierte mRNA einen PolyA-Schwanz von mindestens 50 Nuclotiden, vorzugsweise mindestens 70 Nuclotiden, mehr bevorzugt mindestens 100 Nuclotiden, besonders bevorzugt mindestens 200 Nuclotiden.

10 Für eine effiziente Translation der mRNA ist weiterhin eine wirksame Bindung der Ribosomen an die Ribosomen-Bindungsstelle (Kozak-Sequenz: GCCGCCACCAUGG, das AUG bildet das Startcodon) erforderlich. Diesbezüglich ist festgestellt worden, daß ein erhöhter A/U-Gehalt um diese Stelle herum eine effizientere Ribosomen-Bindung an die mRNA ermöglicht.

15 Des weiteren ist es möglich, in die modifizierte mRNA eine oder mehrere sog. IRES (engl. "internal ribosomal entry side) einzufügen. Eine IRES kann so als alleinige Ribosomen-Bindungsstelle fungieren, sie kann jedoch auch zur Bereitstellung einer mRNA dienen, die mehrere Peptide bzw. Polypeptide codiert, die unabhängig voneinander durch die Ribosomen translatiert werden sollen ("multicistronische mRNA"). Beispiele erfindungsgemäß verwendbarer IRES-Sequenzen sind diejenigen aus Picornaviren (z.B. FMDV), Pestviren (CFV), Polioviren (PV), Enzephalo-Myocarditis-Viren (ECMV), Maul-und-Klauenseuche-Viren (FMDV), Hepatitis-C-Viren (HCV), Klassisches Schweinefieber-Viren (CSFV), Murines-Leukoma-Virus (MLV), Simean-Immundefizienz-Viren (SIV) oder Cricket-Paralysis-Viren (CrPV).

25

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die modifizierte mRNA in den 5'- und/oder 3'-nicht translatierten Bereichen Stabilisierungssequenzen auf, die befähigt sind, die Halbwertszeit der mRNA im Cytosol zu erhöhen.

30 Diese Stabilisierungssequenzen können eine 100%ige Sequenzhomologie zu natürlich vorkommenden Sequenzen, die in Viren, Bakterien und Eukaryoten auftreten, aufweisen, können aber auch teilweise oder vollständig synthetischer Natur sein. Als Beispiel für sta-

bilisierende Sequenzen, die in der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, können die nicht-translatierten Sequenzen (UTR) des β -Globingens, bspw. von *Homo sapiens* oder *Xenopus laevis*, genannt werden. Ein anderes Beispiel einer Stabilisierungssequenz weist die allgemeine Formel (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC auf, die im 3'UTR der
5 sehr stabilen mRNA enthalten ist, die für α -Globin, α -(I)-Collagen, 15-Lipoxygenase oder für Tyrosin-Hydroxylase codiert (vgl. Holcik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 bis 2414). Selbstverständlich können derartige Stabilisierungssequenzen einzeln oder in Kombination miteinander als auch in Kombination mit anderen, einem Fachmann be-
kannten Stabilisierungssequenzen verwendet werden.

10

Zur weiteren Stabilisierung der modifizierten mRNA ist es außerdem bevorzugt, daß diese mindestens ein Analoges natürlich vorkommender Nucleotide aufweist. Dies beruht auf der Tatsache, daß die in den Zellen vorkommenden RNA-abbauenden Enzyme als Sub-
strat vorzugsweise natürlich vorkommende Nucleotide erkennen. Durch Einfügen von
15 Nucleotidanaloga kann daher der RNA-Abbau erschwert werden, wobei die Auswirkung auf die Translationseffizienz bei Einfügen von diesen Analoga, insbesondere in den codierenden Bereich der mRNA, einen positiven oder negativen Effekt auf die Translationseffi-
zienz haben kann.

20 In einer keineswegs abschließenden Aufzählung können als Beispiele erfindungsgemäß verwendbarer Nucleotidanaloga Phosphoramidate, Phosphorthioate, Peptidnucleotide, Methylphosphonate, 7-Deazaguanosin, 5-Methylcytosin und Inosin genannt werden. Die Herstellung derartiger Analoga sind einem Fachmann bspw. aus den US-Patenten
4,373,071, US 4,401,796, US 4,415,732, US 4,458,066, US 4,500,707, US 4,668,777, US
25 4,973,679, US 5,047,524, US 5,132,418, US 5,153,319, US 5,262,530 und 5,700,642 be-
kannt. Erfindungsgemäß können derartige Analoga in nicht-translatierten und translatier-
ten Bereichen der modifizierten mRNA vorkommen.

Des weiteren kann der wirksame Transfer der modifizierten mRNA in die zu behandeln-
30 den Zellen bzw. den zu behandelnden Organismus dadurch verbessert werden, daß die modifizierte mRNA mit einem kationischen Peptid oder Protein assoziiert oder daran ge-

bunden ist. Insbesondere ist dabei die Verwendung von Protamin als polykationischem, Nucleinsäure-bindenden Protein besonders wirksam. Des weiteren ist die Verwendung anderer kationischer Peptide oder Proteine, wie Poly-L-Lysin oder Histonen, ebenfalls möglich. Diese Vorgehensweise zur Stabilisierung der modifizierten mRNA ist in EP-A-
5 1083232 beschrieben, deren diesbezüglicher Offenbarungsgehalt in die vorliegende Erfindung vollumfänglich eingeschlossen ist.

Bei der gentherapeutischen Verwendung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung (bzw. bei der Verwendung der mRNA zur Gentherapie bzw. bei der Verwendung der mRNA zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Gentherapie) codiert die modifizierte mRNA für mindestens ein biologisch wirksames Peptid oder Polypeptid, welches in dem zu behandelnden Patienten bspw. nicht, nur unzureichend oder fehlerhaft gebildet wird. Daher sind Beispiele von der erfindungsgemäßen mRNA codierte Polypeptide Dystrophin, der Chloridkanal, der bei der cystischen Fibrose fehlerhaft verändert ist, Enzyme, die bei metabolischen Erkrankungen, wie Phenylketonurie, Galktosämie, Homocystinurie, Adenosindeaminasedefizienz usw., fehlen bzw. fehlerhaft sind, Enzyme, die an der Synthese von Neurotransmittern, wie Dopamin, Norepinephrin und GABA beteiligt sind, insbesondere Tyrosinhydroxylase und DOPA-Decarboxylase, α -1-Antitrypsin usw. Des weiteren kann die pharmazeutische Zusammensetzung zur Abgabe von Zelloberflächenrezeptoren und Molekülen, die an derartige Rezeptoren binden, verwendet werden, indem die in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltene modifizierte mRNA für ein derartiges biologisch wirksames Protein bzw. Peptid codiert. Beispiele derartiger Proteine, die extrazellulär wirken oder an Zelloberflächenrezeptoren binden, sind bspw. Gewebsplasminogenaktivator (TPA), Wachstumshormone, Insulin, Interferone, Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulisierungsfaktor (GM-CSF), Erythropoietin (EPO) usw. Durch Auswahl geeigneter Wachstumsfaktoren kann die pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung bspw. zur Geweberegeneration verwendet werden. Dadurch können Erkrankungen, die durch eine Gewebedegeneration gekennzeichnet sind, bspw. neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson usw., und andere degenerative Erkrankungen, bspw. Arthrose, behandelt werden. In diesen Fällen codiert die, insbesondere in der pharmazeutischen Zusammensetzung

der vorliegenden Erfindung enthaltene, modifizierte mRNA vorzugsweise für Wachstumsfaktoren aus der TGF- β -Familie, wobei insbesondere EGF, FGF, PDGF, BMP, GDNF, BDNF, GDF und neurotrophe Faktoren, wie NGF, Neutrophine usw. zu nennen sind.

- 5 Ein weiterer Anwendungsbereich der vorliegenden Erfindung ist die Vakzinierung, d.h. die Verwendung der modifizierten mRNA zur Impfung bzw. die Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung als Impfstoff bzw. die Verwendung der modifizierten mRNA zur Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung zur Impfung. Die Vakzinierung beruht auf der Einbringung eines Antigen, im vorliegenden Fall der genetischen
- 10 Information für das Antigen in Form der für das Antigen codierenden modifizierten mRNA, in den Organismus, insbesondere in die Zelle. Die in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltene modifizierte mRNA wird in das Antigen translatiert, d.h. das von der modifizierten mRNA codierte Polypeptid bzw. antigene Peptid wird exprimiert, wodurch eine gegen dieses Polypeptid bzw. antigene Peptid gerichtete Immunantwort stimuliert wird. Bei der Vakzinierung gegen einen pathologischen Keim, d.h. ein Virus, ein
- 15 Bakterium oder ein protozoologischer Keim, wird daher ein Oberflächenantigen eines derartigen Keims zur Vakzinierung mit Hilfe der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, enthaltend die für das Oberflächenantigen codierende modifizierte mRNA, verwendet. Im Fall der Verwendung als genetische Vakzine zur Behandlung von
- 20 Krebs wird die Immunantwort durch Einbringung der genetischen Information für Tumorantigene, insbesondere Proteine, die ausschließlich auf Krebszellen exprimiert werden, erreicht, in dem eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht wird, die eine für ein derartiges Krebsantigen codierende mRNA enthält. Dadurch wird das oder die Krebsantigen(e) im Organismus exprimiert, wodurch eine Immunantwort
- 25 hervorgerufen wird, die wirksam gegen die Krebszellen gerichtet ist.

In ihrer Verwendung als Vakzine kommt die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen (wobei die modifizierte mRNA für ein tumorspezifisches Oberflächenantigen (TSSA) codiert), bspw. zur Behandlung von malignem Melanom, Kolon-Karzinom, Lymphomen, Sarkomen, kleinzelligem

30 Lungenkarzinom, Blastomen usw., in Betracht. Spezifische Beispiele von Tumorantigenen

sind u.a. 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, β -Catenin/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (oder hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-
5 A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 minor bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, PSA, PSM, RAGE, RU1 oder RU2, SAGE, SART-1 oder SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2 und WT1. Des weiteren wird die erfindungsgemäÙe pharmazeutische Zusammensetzung gegen Infektionserkrankungen (z.B. virale Infektionskrankheiten, wie AIDS (HIV), Hepatitis A, B oder C, Herpes, Herpes
10 Zoster (Varizellen), Röteln (Rubeola-Virus), Gelbfieber, Dengue usw. (Flavi-Viren), Grippe (Influenza-Viren), hämorrhagische Infektionskrankheiten (Marburg- oder Ebola-Viren), bakterielle Infektionserkrankungen, wie Legionärskrankheit (Legionella), Magengeschwür (Helicobacter), Cholera (Vibrio), *E.coli*-Infektionen, Staphylokokken-Infektionen, Salmonellen-Infektionen oder Streptokokken-Infektionen (Tetanus), oder
15 protozoologische Infektionserkrankungen (Malaria, Schlafkrankheit, Leishmaniose, Toxoplasmosis, d.h. Infektionen durch Plasmodium, Trypanosomen, Leishmania und Toxoplasmen) eingesetzt. Vorzugsweise werden auch im Falle von Infektionserkrankungen die entsprechenden Oberflächenantigene mit dem stärksten antigenen Potenzial durch die modifizierte mRNA codiert. Bei den genannten Genen pathogener Keime bzw. Organismen, insbesondere bei viralen Genen, ist dies typischerweise eine sekretierte Form eines
20 Oberflächenantigens. Des weiteren werden erfindungsgemäÙ bevorzugt für Polypeptide codierende mRNAs eingesetzt, wobei es sich bei den Polypeptiden um Polypeptide, bspw. der vorstehend genannten Antigene, insbesondere Oberflächenantigene von pathogenen Keimen bzw. Organismen oder Tumorzellen, vorzugsweise sekretierter Proteinformen,
25 handelt.

Darüber hinaus kann die erfindungsgemäÙ modifizierte mRNA neben dem antigenen oder dem gentherapeutisch wirksamen Peptid bzw. Polypeptid auch mindestens einen weiteren funktionalen Abschnitt enthalten, der bspw. für ein die Immunantwort förderndes Cytokin
30 (Monokin, Lymphokin, Interleukin oder Chemokin, wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6,

IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF- α , INF- γ , GM-CFS, LT- α oder Wachstumsfaktoren, wie hGH, codiert.

Des weiteren kann zur Erhöhung der Immunogenizität die erfindungsgemäße pharmazeu-
5 tische Zusammensetzung ein oder mehrere Adjuvanzien enthalten. Unter "Adjuvans" ist
dabei jede chemische oder biologische Verbindung zu verstehen, die eine spezifische Im-
munantwort begünstigt. In Abhängigkeit der verschiedenen Arten von Adjuvanzien kön-
nen diesbezüglich verschiedene Mechanismen in Betracht kommen. Bspw. bilden Verbin-
10 dungen, die eine Endocytose der in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen
modifizierten mRNA durch dendritische Zellen (DC) fördern, eine erste Klasse von ver-
wendbaren Adjuvanzien. Andere Verbindungen, welche die Reifung der DC erlauben,
bspw. Lipopolysaccharide, TNF- α oder CD40-Ligand, sind eine weitere Klasse geeigneter
Adjuvanzien. Allgemein kann jedes das Immunsystem beeinflussende Agens von der Art
15 eines "Gefahrsignals" (LPS, GP96, Oligonucleotide mit dem CpG-Motiv) oder Cytokine,
wie GM-CFS, als Adjuvans verwendet werden, welche es erlauben, eine Immunantwort
gegen ein Antigen, das durch die modifizierte mRNA codiert wird, zu erhöhen und/oder
gerichtet zu beeinflussen. Insbesondere sind dabei die vorstehend genannten Cytokine
bevorzugt. Weitere bekannte Adjuvanzien sind Aluminiumhydroxid, das Freud'sche Ad-
20 juvans sowie die vorstehend genannten stabilisierenden kationischen Peptide bzw. Poly-
peptide, wie Protamin. Des weiteren sind Lipopeptide, wie Pam3Cys, ebenfalls besonders
geeignet, um als Adjuvanzien in der pharmazeutischen Zusammensetzung der vorlie-
genden Erfindung eingesetzt zu werden; vgl. Deres et al, Nature 1989, 342: 561-564.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung enthält neben der modifizier-
25 ten mRNA einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder ein pharmazeutisch ver-
trägliches Vehikel. Entsprechende Wege zur geeigneten Formulierung und Herstellung der
erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung sind bei "Remington's Pharma-
ceutical Sciences" (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980) offenbart, das vollinhaltlich Be-
standteil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung ist. Für die parenterale Verabrei-
30 chung kommen als Trägerstoffe bspw. steriles Wasser, sterile Kochsalzlösungen, Polyal-
kylenglykole, hydrogenierte Naphthalen und insbesondere biokompatible Lactidpolymere,

Lactid/Glycolidcopolymer oder Polyoxyethylen-/Polyoxypropylencopolymere in Betracht. Erfindungsgemäße Zusammensetzungen können Füllsubstanzen oder Substanzen, wie Lactose, Mannitol, Substanzen zur kovalenten Anknüpfung von Polymeren, wie z.B. Polyethylenglykol an erfindungsgemäße Inhibitoren, Komplexierung mit Metallionen oder

5 Einfluß von Materialien in oder auf besondere Präparationen von Polymerverbindungen, wie z.B. Polylactat, Polyglykolsäure, Hydrogel oder auf Liposomen, Mikroemulsion, Micellen, unilamellare oder multilamellare Vesikel, Erythrozyten-Fragmente oder Sphäroplasten, enthalten. Die jeweiligen Ausführungsformen der Zusammensetzungen werden abhängig vom physikalischen Verhalten, beispielsweise in Hinblick auf die Löslichkeit, die

10 Stabilität, Bioverfügbarkeit oder Abbaubarkeit gewählt. Kontrollierte oder konstante Freisetzung der erfindungsgemäßen Wirkstoffkomponente in der Zusammensetzung schließt Formulierungen auf der Basis lipophiler Depots ein (z.B. Fettsäuren, Wachse oder Öle). Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden auch Beschichtungen erfindungsgemäßer Substanzen oder Zusammensetzungen, enthaltend solche Substanzen, nämlich Beschichtungen mit Polymeren offenbart (z.B. Poloxamere oder Poloxamine). Weiterhin können

15 erfindungsgemäßen Substanzen bzw. Zusammensetzungen protektive Beschichtungen, z.B. Proteaseinhibitoren oder Permeabilitätsverstärker, aufweisen. Bevorzugte Träger sind typischerweise wässrige Trägermaterialien, wobei Wasser zur Injektion (WFI) oder Wasser, gepuffert mit Phosphat, Citrat oder Acetat usw. verwendet wird, und der pH typischerweise auf 5,0 bis 8,0, vorzugsweise 6,0 bis 7,0, eingestellt wird. Der Träger bzw. das

20 Vehikel wird zusätzlich vorzugsweise Salzbestandteile enthalten, z.B. Natriumchlorid, Kaliumchlorid oder andere Komponenten, welche die Lösung bspw. isotonisch machen. Weiterhin kann der Träger bzw. das Vehikel neben den vorstehend genannten Bestandteilen zusätzliche Komponenten, wie humanes Serumalbumin (HSA), Polysorbat 80, Zucker

25 oder Aminosäuren, enthalten.

Die Art und Weise der Verabreichung und die Dosierung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung hängen von der zu behandelnden Erkrankung und deren Fortschrittsstadium, wie auch dem Körpergewicht, dem Alter und dem Geschlecht des

30 Patienten ab.

Die Konzentration der modifizierten mRNA in derartigen Formulierungen kann daher innerhalb eines weiten Bereichs von 1 µg bis 100 mg/ml variieren. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung wird vorzugsweise parenteral, bspw. intravenös, intraarteriell, subkutan, intramuskulär, dem Patienten verabreicht. Ebenso ist es möglich, die pharmazeutische Zusammensetzung topisch oder oral zu verabreichen.

Somit wird erfindungsgemäß auch ein Verfahren zur Behandlung der vorstehend genannten Krankheiten bzw. ein Impfverfahren zur Prävention der vorstehend genannten Erkrankungen bereitgestellt, welches das Verabreichen der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung an einen Patienten, insbesondere einen Menschen, umfasst.

Darüber hinaus wird ebenfalls ein Verfahren bereitgestellt, dass der Ermittlung der modifizierten Sequenz der in der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen mRNA dient. Dabei wird erfindungsgemäß die Adaptierung der RNA-Sequenzen mit zwei unterschiedlichen Optimierungszielen durchgeführt: Zum einen mit größtmöglichen G/C-Gehalt, zum anderen unter bestmöglicher Berücksichtigung der Häufigkeit der tRNAs gemäß Codon Usage. Im ersten Schritt des Verfahrens wird eine virtuelle Translation einer beliebigen RNA(oder DNA)-Sequenz durchgeführt, um die entsprechende Aminosäuresequenz zu generieren. Ausgehend von der Aminosäuresequenz wird eine virtuelle reverse Translation durchgeführt, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes Wahlmöglichkeiten für die entsprechenden Codons liefert. Je nach geforderter Optimierung bzw. Modifizierung werden zur Auswahl der geeigneten Codons entsprechende Selektionslisten und Optimierungsalgorithmen verwendet. Die Ausführung der Algorithmen erfolgt typischerweise mit Hilfe einer geeigneten Software auf einem Computer. So wird die optimierte mRNA-Sequenz erstellt und kann bspw. mit Hilfe einer entsprechenden Anzeigevorrichtung ausgegeben und mit der ursprünglichen (Wildtyp-)Sequenz verglichen werden. Das gleiche gilt auch für die Häufigkeit der einzelnen Nucleotide. Die Änderungen gegenüber der ursprünglichen Nucleotidsequenz werden dabei vorzugsweise hervorgehoben. Weiter werden gemäß einer bevorzugten Ausführungsform in der Natur bekannte stabile Sequenzen eingelesen, welche die Grundlage für eine gemäß natürlichen Sequenzmotiven stabilisierte RNA bieten können. Es kann ebenfalls eine Sekundärstruktur-

analyse vorgesehen werden, die anhand von Strukturberechnungen stabilisierende und instabilisierende Eigenschaften bzw. Bereiche der RNA analysieren kann.

Die Figuren zeigen:

5

Fig. 1 zeigt Wildtyp- und modifizierte Sequenzen für das Influenza-Matrix-Protein.

Fig. 1A zeigt das Wildtyp-Gen und Fig. 1B zeigt die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code). Fig. 1C zeigt eine für das Influenza-Matrix-Protein codierende Gen-Sequenz, deren G/C-Gehalt gegenüber der Wildtyp-Sequenz erhöht ist. Fig. 1D

10 zeigt die Sequenz eines Gens, das für eine sekretierte Form des Influenza-Matrix-Proteins codiert (einschließlich einer N-terminalen Signalsequenz), wobei der G/C-Gehalt der Sequenz gegenüber der Wildtyp-Sequenz erhöht ist. Fig. 1E zeigt eine für das Influenza-Matrix-Protein codierende mRNA, die im Vergleich zur Wildtyp-mRNA stabilisierende Sequenzen enthält. Fig. 1F zeigt eine für das Influenza-Matrix-Protein codierende mRNA,

15 die neben stabilisierenden Sequenzen einen erhöhten G/C-Gehalt aufweist.

Fig. 1G zeigt ebenfalls eine modifizierte mRNA, die für die sekretierte Form des Influenza-Matrix-Proteins codiert und im Vergleich zum Wildtyp stabilisierende Sequenzen und einen erhöhten GC-Gehalt aufweist. In Fig. 1A und Fig. 1C bis 1G sind die Start- und Stop-Codons fett hervorgehoben. Gegenüber der Wildtyp-Sequenz von Fig. 1A veränderte

20 Nucleotide sind in den Figuren 1C bis 1G in Großbuchstaben dargestellt.

Fig. 2 zeigt Wildtyp- und erfindungsgemäß modifizierte Sequenzen, die für das Tumoran-tigen MAGE1 codieren.

Fig. 2A zeigt die Sequenz des Wildtyp-Gens und Fig. 2B die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (Drei-Buchstaben-Code). Fig. 2C zeigt eine für MAGE1 codierende modifizier-te mRNA, deren G/C-Gehalt gegenüber dem Wildtyp erhöht ist. Fig. 2D zeigt die Sequenz einer für MAGE1 codierenden modifizierten mRNA, bei der die Codon-Verwendung be-züglich der Codierung möglichst häufig in der Zelle vorkommender tRNA optimiert wur-de. Start- und Stop-Codons sind jeweils fett gekennzeichnet.

30

Die folgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung näher, ohne sie einzuschrän-ken.

Beispiel 1

Als beispielhafte Ausführungsform des Verfahrens zu Ermittlung der Sequenz einer erfindungsgemäß modifizierten mRNA wurde ein Computerprogramm erstellt, das mit Hilfe
5 des genetischen Codes bzw. dessen degenerativer Natur die Nucleotid-Sequenz einer beliebigen mRNA derart modifiziert, daß sich ein maximaler G/C-Gehalt in Verbindung mit der Verwendung von Codons, die für möglichst häufig in der Zelle vorkommende tRNAs codieren, ergibt, wobei die durch die modifizierte mRNA codierte Aminosäure-Sequenz
10 gegenüber der nicht-modifizierten Sequenz identisch ist. Alternativ kann auch nur der G/C-Gehalt oder nur die Codonverwendung gegenüber der ursprünglichen Sequenz modifiziert werden.

Der Quellcode in Visual Basic 6.0 (eingesetzte Entwicklungsumgebung: Microsoft Visual
15 Studio Enterprise 6.0 mit Servicepack 3) ist im Anhang angegeben.

Beispiel 2

Mit Hilfe des Computerprogramms von Beispiel 1 wurde ein RNA-Konstrukt mit einer
20 hinsichtlich Stabilisierung und Translationseffizienz optimierten Sequenz des lac-Z-Gens aus *E.coli* erstellt. Es konnte so ein G/C-Gehalt von 69% (im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz von 51%; vgl. Kalnins et al., EMBO J. 1983, 2(4): 593-597) erzielt werden. Durch die Synthese überlappender Oligonucleotide, welche die modifizierte Sequenz aufweisen, wurde die optimierte Sequenz gemäß im Stand der Technik bekannter Verfahren
25 hergestellt. Die endständigen Oligonucleotide wiesen die folgenden Restriktionsschnittstellen auf: Am 5'-Ende eine *EcoRV*- sowie am 3'-Ende eine *BglII*-Schnittstelle. Über Verdau mit *EcoRV/BglII* wurde die modifizierte lacZ-Sequenz in das Plasmid pT7Ts (GenBank-Zugriffsnummer U 26404; vgl. Lai et al., s.o.). pT7Ts enthält als nicht-translatierte Regionen Sequenzen aus dem β -Globingen von *Xenopus levis* jeweils an 5'
30 und 3'. Das Plasmid wurde vor dem Einfügen der modifizierten lacZ-Sequenz mit den genannten Restriktionsenzymen geschnitten.

Das pT7Ts-lac-Z-Konstrukt wurde in Bakterien vermehrt und durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. 2 µg des Konstrukts wurden *in vitro* mittels dem einem Fachmann bekannten Verfahren transkribiert, wodurch die modifizierte mRNA hergestellt wurde.

5

Beispiel 3

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Computerprogramms von Beispiel 1 wurde das Gen für das Influenza-Matrix-Protein (Wildtyp-Sequenz vgl. Fig. 1A, abgeleitete Aminosäuresequenz Fig. 1B) optimiert. Dadurch wurde die in Fig. 1C dargestellte G/C-reiche Sequenzvariante erstellt. Ebenfalls wurde eine für die sekretierte Form des Influenza-Matrix-Proteins codierende G/C-reiche Sequenz, die für eine N-terminale Signalsequenz codiert, ermittelt (vgl. Fig. 1D). Die sekretierte Form des Influenza-Matrix-Proteins hat den Vorteil, daß sie eine im Vergleich zur nicht-sekretierten Form erhöhte Immunogenizität aufweist.

10
15

Ausgehend von den optimierten Sequenzen wurden entsprechende mRNA-Moleküle entworfen. Die hinsichtlich G/C-Gehalt und Codonverwendung optimierte mRNA für das Influenza-Matrix-Protein wurde zusätzlich mit stabilisierenden Sequenzen im 5'- und 3'-Bereich (die Stabilisierungssequenzen stammen aus den 5'- bzw. 3'-UTRs des β-Globin-mRNA von *Xenopus laevis*; vgl. pT7Ts-Vektor in Lai et al., s.o.) ausgestattet (vgl. Fig. 1E und 1F). Desgleichen wurde auch die für die sekretierte Form des Influenza-Matrix-Proteins codierende mRNA im translatierten Bereich sequenzoptimiert und mit den genannten stabilisierenden Sequenzen versehen (vgl. Fig. 1G).

20
25

Beispiel 4

Mit Hilfe des Computerprogramms von Beispiel 1 wurde die für das Tumorentigen MA-GE1 codierende mRNA modifiziert. Dadurch wurde die in Fig. 2C gezeigte Sequenz ermittelt, die im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (275 G, 244 C) einen um 24% höheren G/C-Gehalt aufweist (351 G, 291 C). Des Weiteren wurde die Wildtyp-Sequenz durch al-

30

ternative Codonverwendung hinsichtlich der Translationseffizienz aufgrund der Codierung von in der Zelle häufiger vorkommenden tRNAs verbessert (vgl. Fig. 2D). Durch die alternative Codonverwendung wurde der G/C-Gehalt ebenfalls um 24% erhöht.

Anhang: Quelltext eines erfindungsgemäßen Computerprogramms

Curevac_Genetic_Controls mit folgenden Modulen

```
5
Name: Curevac_Genetic_Controls.vbp
Code:
Type=Control
Reference=*G{00020430-0000-0000-C000-000000000046}#2.0#0#.\.\WINNT\System32\STDOLE2.TLB#OLE Automation
10 Object={0D452EE1-E08F-101A-852E-02608C4D0BB4}# 2.0# 0; FM20.DLL
Object={F9043C88-F6F2-101A-A3C9-08002B2F49FB}# 1.2# 0; COMDLG32.OCX
UserControl=Curevac_Amino.ctl
Startup="(None)"
HelpFile=""
15 Title="Curevac Genetic Controls"
Command32=""
Name="Curevac_Genetic_Controls"
HelpContextID="0"
CompatibleMode="1"
20 MajorVer=1
MinorVer=0
RevisionVer=0
AutoIncrementVer=0
ServerSupportFiles=0
25 VersionComments="the RNA people"
VersionCompanyName="Cure Vac GmbH"
VersionFileDescription="Controls for Handling of Nucleotids"
VersionLegalCopyright="by Christian Klump"
VersionLegalTrademarks="Curevac Genetic Controls(tm)"
30 VersionProductName="Curevac Genetic Controls"
CompilationType=0
OptimizationType=0
FavorPentiumPro(tm)=0
CodeViewDebugInfo=0
35 NoAliasing=0
BoundsCheck=0
OverflowCheck=0
FIPointCheck=0
FDIVCheck=0
40 UnroundedFP=0
StartMode=1
Unattended=0
Retained=0
ThreadPerObject=0
45 MaxNumberOfThreads=1
ThreadingModel=1
DebugStartupOption=1
```

DebugStartupComponent=Curevac_Amino

```
5 Name: Curevac_Amino.ctl
Code:
VERSION 5.00
Object = "{0D452EE1-E08F-101A-852E-02608C4D0BB4}# 2.0# 0"; "FM20.DLL"
Begin VB.UserControl Curevac_Amino
10 CanGetFocus = 0 'False
ClientHeight = 690
ClientLeft = 0
ClientTop = 0
ClientWidth = 1200
15 ScaleHeight = 690
ScaleWidth = 1200
Begin VB.Line linLower
X1 = 0
X2 = 1080
20 Y1 = 600
Y2 = 600
End
Begin VB.Line linUpper
X1 = 120
25 X2 = 1080
Y1 = 0
Y2 = 0
End
Begin MSForms.Label lblAminoAcid
30 DragMode = 1 'Automatic
Height = 255
Left = 120
TabIndex = 1
Top = 360
35 Width = 975
Size = "1720;450"
SpecialEffect = 1
FontName = "Lucida Sans Unicode"
FontEffects = 1073741826
40 FontHeight = 165
FontCharSet = 0
FontPitchAndFamily = 2
ParagraphAlign = 3
End
45 Begin MSForms.Label lblTriplet
DragMode = 1 'Automatic
Height = 255
Left = 120
```

```
    TabIndex    = 0
    Top         = 120
    Width       = 975
    Size        = "1720;450"
5   SpecialEffect = 1
    FontHeight  = 165
    FontCharSet = 0
    FontPitchAndFamily = 2
    ParagraphAlign = 3
10  End
    End
    Attribute VB_Name = "Curevac_Amino"
    Attribute VB_GlobalNameSpace = False
    Attribute VB_Creatable = True
15  Attribute VB_PredeclaredId = False
    Attribute VB_Exposed = True
    Option Explicit

    Private msAAShortcut As String
20  Private msAAName As String
    Private msBestTriplet As String
    Private msSecondBest As String
    Private msThirdBest As String
    Private msTriplet As String
25  Private msBackColor As Long
    Private mbShowOriginal As Boolean

    Public Enum enuAminoAcid
30  amaGlycin
    amaAlanin
    amaValin
    amaLeucin
    amaIsoLeucin
35  amaPhenylalanin
    amaTyrosin
    amaTryptophan
    amaAsparaginAcid
    amaAsparagin
40  amaGlutaminAcid
    amaGlutamin
    amaSerin
    amaThreonin
    amaCystein
45  amaMethionin
    amaProlin
    amaHistidin
    amaLysin
```

```
amaStop
amaStart
End Enum

5 Private Sub Main()

    Call UserControl_Resize

End Sub

10 Public Sub Translation(ByVal sTriplet As String)

    msTriplet = sTriplet

15 Select Case sTriplet
    Case "GGU", "GGC", "GGA", "GGG"
        msAAShortcut = "GLY"
    Case "GCU", "GCC", "GCA", "GCG"
        msAAShortcut = "ALA"
20 Case "GUU", "GUC", "GUA", "GUG"
        msAAShortcut = "VAL"
    Case "UUA", "UUG", "CUU", "CUA", "CUG", "CUC"
        msAAShortcut = "LEU"
    Case "AUA", "AUU", "AUC"
25 Case "UUU", "UUC"
        msAAShortcut = "PHE"
    Case "UAU", "UAC"
        msAAShortcut = "TYR"
30 Case "UGG"
        msAAShortcut = "TRP"
    Case "GAU", "GAC"
        msAAShortcut = "ASP"
    Case "AAU", "AAC"
35 Case "GAA", "GAG"
        msAAShortcut = "GLU"
    Case "CAA", "CAG"
        msAAShortcut = "GLN"
40 Case "AGU", "AGC", "UCA", "UCU", "UCG", "UCC"
        msAAShortcut = "SER"
    Case "ACA", "ACU", "ACG", "ACC"
        msAAShortcut = "THR"
    Case "UGU", "UGC"
45 Case "AUG"
        msAAShortcut = "CYS"
    Case "AUG"
        msAAShortcut = "MET"
    Case "CCA", "CCU", "CCG", "CCC"
```

```
    msAAShortcut = "PRO"  
    Case "CAU", "CAC"  
        msAAShortcut = "HIS"  
    Case "AGA", "AGG", "CGA", "CGU", "CGG", "CGC"  
5      msAAShortcut = "ARG"  
    Case "AAA", "AAG"  
        msAAShortcut = "LYS"  
    Case "UAA", "UAG", "UGA"  
        msAAShortcut = "STP"  
10     End Select  
        Call Synthesis(msAAShortcut)  
        Call Show  
  
End Sub  
15  
Public Sub Synthesis(ByVal sShortCut As String)  
  
    msAAShortcut = sShortCut 'nur falls die Sub extern angesprochen wird  
  
20     Select Case msAAShortcut  
        Case "GLY"  
            msAAName = "Glycin"  
            msBestTriplett = "GGC"  
            msSecondBest = "GGG"  
25            msBackColor = 8421631  
        Case "ALA"  
            msAAName = "Alanin"  
            msBestTriplett = "GCG"  
            msSecondBest = "GCC"  
30            msBackColor = 8454143  
        Case "VAL"  
            msAAName = "Valin"  
            msBestTriplett = "GUC"  
            msSecondBest = "GUG"  
35            msBackColor = 8454016  
        Case "LEU"  
            msAAName = "Leucin"  
            msBestTriplett = "CUG"  
            msSecondBest = "CUC"  
40            msBackColor = 16777088  
        Case "ILE"  
            msAAName = "Isoleucin"  
            msBestTriplett = "AUC"  
            msBackColor = 12615935  
45        Case "PHE"  
            msAAName = "Phenylalanin"  
            msBestTriplett = "UUC"  
            msBackColor = 255
```

Case "TYR"
msAAName = "Tyrosin"
msBestTriplett = "UAC"
msBackColor = 4210816
5 Case "TRP"
msAAName = "Tryptophan"
msBestTriplett = "UGG"
msBackColor = 4227327
10 Case "ASP"
msAAName = "Asparaginsäure"
msBestTriplett = "GAC"
msBackColor = 8388863
15 Case "ASN"
msAAName = "Asparagin"
msBestTriplett = "AAC"
msBackColor = 4227200
20 Case "GLU"
msAAName = "Glutaminsäure"
msBestTriplett = "GAG"
msBackColor = 32768
25 Case "GLN"
msAAName = "Glutamin"
msBestTriplett = "GGC"
msBackColor = 8421440
30 Case "SER"
msAAName = "Serin"
msBestTriplett = "AGC"
msSecondBest = "UCG"
msThirdBest = "UCC"
msBackColor = 16512
35 Case "THR"
msAAName = "Threonin"
msBestTriplett = "ACG"
msBackColor = 16711680
40 Case "CYS"
msAAName = "Cystein"
msBestTriplett = "UGC"
msBackColor = 6932960
45 Case "MET"
msAAName = "Methionin"
msBestTriplett = "AUG"
msBackColor = 10417643
Case "PRO"
msAAName = "Prolin"
msBestTriplett = "CCG"
msSecondBest = "CCC"
msBackColor = 12898746
Case "HIS"

```
msAAName = "Histidin"
msBestTriplet = "CAC"
msBackColor = 12898746
5 Case "ARG"
msAAName = "Arginin"
msBestTriplet = "CGC"
msSecondBest = "CGG"
msBackColor = 6174925
10 Case "LYS"
msAAName = "Lysin"
msBestTriplet = "AAG"
msBackColor = 14141641
Case "STP"
15 msAAName = "Stop"
msBestTriplet = "UGA"
msSecondBest = "UAG"
msBackColor = 11332093
End Select

20 End Sub

Public Sub Show()

25 lblAminoAcid.Caption = msAAShortcut
If mbShowOriginal = True Then
    lblTriplet.Caption = msTriplet
Else
    lblTriplet.Caption = msBestTriplet
End If
30 lblAminoAcid.BackColor = msBackColor
    lblTriplet.BackColor = msBackColor

End Sub

35 Public Function ChooseBestGC(sShortCut As String)

Select Case sShortCut
Case "GLY"
40 msAAName = "Glycin"
msBestTriplet = "GGC"
msSecondBest = "GGG"
msBackColor = 8421631
Case "ALA"
45 msAAName = "Alanin"
msBestTriplet = "GCG"
msSecondBest = "GCC"
msBackColor = 8454143
Case "VAL"
```


msAAName = "Valin"
msBestTriplett = "GUC"
msSecondBest = "GUG"
msBackColor = 8454016
5 Case "LEU"
msAAName = "Leucin"
msBestTriplett = "CUG"
msSecondBest = "CUC"
msBackColor = 16777088
10 Case "ILE"
msAAName = "Isoleucin"
msBestTriplett = "AUC"
msBackColor = 12615935
Case "PHE"
15 msAAName = "Phenylalanin"
msBestTriplett = "UUC"
msBackColor = 255
Case "TYR"
20 msAAName = "Tyrosin"
msBestTriplett = "UAC"
msBackColor = 4210816
Case "TRP"
msAAName = "Tryptophan"
msBestTriplett = "UGG"
25 msBackColor = 4227327
Case "ASP"
msAAName = "Asparaginsäure"
msBestTriplett = "GAC"
msBackColor = 8388863
30 Case "ASN"
msAAName = "Asparagin"
msBestTriplett = "AAC"
msBackColor = 4227200
Case "GLU"
35 msAAName = "Glutaminsäure"
msBestTriplett = "GAG"
msBackColor = 16711808
Case "GLN"
40 msAAName = "Glutamin"
msBestTriplett = "GGC"
msBackColor = 12632256
Case "SER"
45 msAAName = "Serin"
msBestTriplett = "AGC"
msSecondBest = "UCG"
msThirdBest = "UCC"
msBackColor = 8421504
Case "THR"

```
    msAAName = "Threonin"  
    msBestTriplet = "ACG"  
    msBackColor = &HD4COFF  
5  Case "CYS"  
    msAAName = "Cystein"  
    msBestTriplet = "UGC"  
    msBackColor = &HD5COFF  
    Case "MET"  
10  msAAName = "Methionin"  
    msBestTriplet = "AUG"  
    msBackColor = &HD6COFF  
    Case "PRO"  
    msAAName = "Prolin"  
15  msBestTriplet = "CCG"  
    msSecondBest = "CCC"  
    msBackColor = &HD7COFF  
    Case "HIS"  
    msAAName = "Histidin"  
20  msBestTriplet = "CAC"  
    msBackColor = &HD8COFF  
    Case "ARG"  
    msAAName = "Arginin"  
25  msBestTriplet = "CGC"  
    msSecondBest = "CGG"  
    msBackColor = &HD9COFF  
    Case "LYS"  
    msAAName = "Lysin"  
    msBestTriplet = "AAG"  
30  msBackColor = &HE0COFF  
    Case "STP"  
    msAAName = "Stop"  
    msBestTriplet = "UGA"  
    msSecondBest = "UAG"  
35  msBackColor = &HE1COFF  
    End Select  
  
End Function  
  
40  
  
Public Property Let ShowOriginal(ByVal bNewValue As Boolean)  
    mbShowOriginal = bNewValue  
End Property  
  
45  
Public Property Get ShowOriginal() As Boolean  
    ShowOriginal = mbShowOriginal  
End Property
```

```
Public Property Get AAShortcut() As String
    AAShortcut = msAAShortcut
End Property
5
Public Property Get AAName() As String
    AAName = msAAName
End Property

10 Public Property Get BestTriplet() As String
    BestTriplet = msBestTriplet
End Property

Public Property Get SecondBest() As String
15     SecondBest = msSecondBest
End Property

Public Property Get ThirdBest() As String
    ThirdBest = msThirdBest
20 End Property

Public Property Get BackColor() As String
    BackColor = msBackColor
End Property
25

Private Property Get Triplet() As String
    Triplet = msTriplet
End Property
30

Private Sub UserControl_Resize()

Dim lOuterWidth As Long
Dim lDistance As Long
35

    lDistance = 30

    lOuterWidth = ScaleWidth + lDistance

40

    With lblTriplet
        .Top = 0
        .Left = lDistance / 2
        .Width = ScaleWidth - lDistance
45     .Height = ScaleHeight / 2 + 30
    End With
    With lblAminoAcid
        .Top = ScaleHeight / 2 - 30
```

```

        .Left = IDistance / 2
        .Width = ScaleWidth - IDistance
        .Height = ScaleHeight / 2
    End With
5   With linUpper
        .X1 = ScaleLeft
        .Y1 = 0
        .X2 = ScaleWidth
        .Y2 = 0
10  End With
    With linLower
        .X1 = ScaleLeft
        .Y1 = ScaleHeight - 20
        .X2 = ScaleWidth
15  .Y2 = ScaleHeight - 20
    End With

End Sub

```

20

Curevac_RNA_Optimizer mit folgenden Modulen

```

25  Name: Curevac_RNA_Optimizer.vbp
    Code:
    Type=Exe
    Reference=*G{00020430-0000-0000-C000-
000000000046}# 2.0# 0# ..\..\WINNT\System32\STDOLE2.TLB# OLE Automation
30  Object={F9043C88-F6F2-101A-A3C9-08002B2F49FB}# 1.2# 0; COMDLG32.OCX
    Module=basMain; basMain.bas
    Form=mdiMain.frm
    Object=*\ACurevac Genetic Controls.vbp
    Object={38911DA0-E448-11D0-84A3-00DD01104159}# 1.1# 0; COMCT332.OCX
35  Object={3B7C8863-D78F-101B-B9B5-04021C009402}# 1.2# 0; RICHTX32.OCX
    Form=frmOutPut.frm
    Form=frmStatistics.frm
    Module=basPublics; basPublics.bas
    Form=frmOptions.frm
40  Form=frmInput.frm
    Form=frmDisplay.frm
    Form=frmAbout.frm
    Startup="mdiMain"
    HelpFile=""
45  Title="RNA-Optimizer"
    Command32=""
    Name="RNA_Optimizer"
    HelpContextID="0"

```

```
CompatibleMode="0"  
MajorVer=1  
MinorVer=0  
RevisionVer=0  
5 AutoIncrementVer=0  
ServerSupportFiles=0  
VersionComments="the RNA people"  
VersionCompanyName="CureVac GmbH"  
VersionFileDescription="Application for Optimization of RNA"  
10 VersionLegalCopyright="by Christian Klump"  
VersionLegalTrademarks="Curevac RNA-Optimizer(tm)"  
VersionProductName="Curevac RNA-Optimizer"  
CompilationType=0  
OptimizationType=0  
15 FavorPentiumPro(tm)=0  
CodeViewDebugInfo=0  
NoAliasing=0  
BoundsCheck=0  
OverflowCheck=0  
20 FIPointCheck=0  
FDIVCheck=0  
UnroundedFP=0  
StartMode=0  
Unattended=0  
25 Retained=0  
ThreadPerObject=0  
MaxNumberOfThreads=1  
DebugStartupOption=0  
  
30 Name: basMain.bas  
Code:  
Attribute VB_Name = "basMain"  
Option Explicit  
35 Private Type udtAminoAcid  
    sShortcut As String  
    sName As String  
    sBestTriplet As String  
40    sSecondBest As String  
    sThirdBest As String  
End Type  
  
Private mastrAminoAcids() As udtAminoAcid  
45 Public Sub RebuildChain(bShowOriginal As Boolean)  
  
Dim iLoop As Integer
```

```

For iLoop = 1 To glAminoCounter
  With frmDisplay.Curevac_Amino1(iLoop)
    .ShowOriginal = bShowOriginal
5    .Show
    End With
  Next iLoop

End Sub

10 Public Sub ResetPublics()
  gsOriginalCode = ""
  gsFormattedCode = ""
  glCodeLength = ""
15 End Sub

Public Sub BuildAminoChain(ByVal sTempCode As String, bGraphical As Boolean)

20 Dim lVerticalOffset As Long
  Dim lHorizontalOffset As Long
  Dim lTop As Long

  Dim asTriplets() As String
25 Dim sAminoChain As String
  Dim lLoop As Long

  If bGraphical = True Then
    lTop = frmDisplay.optNucleotids(0).Height + 40
30 End If
  ReDim mastrAminoAcids(glAminoCounter)
  asTriplets = Split(sTempCode)
  For lLoop = 0 To glAminoCounter - 1
    If bGraphical = True Then
35 Load frmDisplay.Curevac_Amino1(lLoop + 1)
      With frmDisplay.Curevac_Amino1(lLoop + 1)

        Call .Translation(asTriplets(lLoop))

40 .Left = lLoop * .Width - lHorizontalOffset
        .Top = lVerticalOffset + lTop
        If .Left + 2 * .Width > frmDisplay.ScaleWidth Then
          lVerticalOffset = lVerticalOffset + .Height + 150
          lHorizontalOffset = lLoop * .Width + .Width
45 End If

        sAminoChain = sAminoChain + .aaShortcut + ", "
        .Visible = True

```

```
End With
Else
    mastrAminoAcids(iLoop) = Translation(asTriplets(iLoop))
    sTest = sTest + mastrAminoAcids(iLoop).sName + ", "
5 End If
Next
If bGraphical = True Then
    frmDisplay.Show
Else
10 Call frmOutPut.Show
End If
Debug.Print sAminoChain
End Sub

15 Private Function Translation(ByVal sTriplet As String) As udtAminoAcid

    Dim stiTemp As udtAminoAcid

    If mdiMain.optKindOfOptimize(0) = True Then
20 'Optimization for Most GC
        Select Case sTriplet
            Case "GGU", "GGC", "GGA", "GGG"
                stiTemp.sShortcut = "GLY"
                stiTemp.sName = "Glycin"
25 stiTemp.sBestTriplet = "GGC"
                stiTemp.sSecondBest = "GGG"
            Case "GCU", "GCC", "GCA", "GCG"
                stiTemp.sShortcut = "ALA"
                stiTemp.sName = "Alanin"
30 stiTemp.sBestTriplet = "GCG"
                stiTemp.sSecondBest = "GCC"
            Case "GUU", "GUC", "GUA", "GUG"
                stiTemp.sShortcut = "VAL"
                stiTemp.sName = "Valin"
35 stiTemp.sBestTriplet = "GUC"
                stiTemp.sSecondBest = "GUG"
            Case "UUA", "UUG", "CUU", "CUA", "CUG", "CUC"
                stiTemp.sShortcut = "LEU"
                stiTemp.sName = "Leucin"
40 stiTemp.sBestTriplet = "CUG"
                stiTemp.sSecondBest = "CUC"
            Case "AUA", "AUU", "AUC"
                stiTemp.sShortcut = "ILE"
                stiTemp.sName = "Isoleucin"
45 stiTemp.sBestTriplet = "AUC"
            Case "UUU", "UUC"
                stiTemp.sShortcut = "PHE"
                stiTemp.sName = "Phenylalanin"
```

```
    stiTemp.sBestTriplett = "UUC"
Case "UAU", "UAC"
    stiTemp.sShortcut = "TYR"
    stiTemp.sName = "Tyrosin"
5    stiTemp.sBestTriplett = "UAC"
Case "UGG"
    stiTemp.sShortcut = "TRP"
    stiTemp.sName = "Tryptophan"
10    stiTemp.sBestTriplett = "UGG"
Case "GAU", "GAC"
    stiTemp.sShortcut = "ASP"
    stiTemp.sName = "Asparaginsäure"
    stiTemp.sBestTriplett = "GAC"
15    Case "AAU", "AAC"
        stiTemp.sShortcut = "ASN"
        stiTemp.sName = "Asparagin"
        stiTemp.sBestTriplett = "AAC"
    Case "GAA", "GAG"
        stiTemp.sShortcut = "GLU"
20    stiTemp.sName = "Glutaminsäure"
        stiTemp.sBestTriplett = "GAG"
    Case "CAA", "CAG"
        stiTemp.sShortcut = "GLN"
        stiTemp.sName = "Glutamin"
25    stiTemp.sBestTriplett = "CAG"
    Case "AGU", "AGC", "UCA", "UCU", "UCG", "UCC"
        stiTemp.sShortcut = "SER"
        stiTemp.sName = "Serin"
        stiTemp.sBestTriplett = "AGC"
30    stiTemp.sSecondBest = "UCG"
        stiTemp.sThirdBest = "UCC"
    Case "ACA", "ACU", "ACG", "ACC"
        stiTemp.sShortcut = "THR"
        stiTemp.sName = "Threonin"
35    stiTemp.sBestTriplett = "ACG"
    Case "UGU", "UGC"
        stiTemp.sShortcut = "CYS"
        stiTemp.sName = "Cystein"
        stiTemp.sBestTriplett = "UGC"
40    Case "AUG"
        stiTemp.sShortcut = "MET"
        stiTemp.sName = "Methionin"
        stiTemp.sBestTriplett = "AUG"
    Case "CCA", "CCU", "CCG", "CCC"
45    stiTemp.sShortcut = "PRO"
        stiTemp.sName = "Prolin"
        stiTemp.sBestTriplett = "CCG"
        stiTemp.sSecondBest = "CCC"
```



```
Case "CAU", "CAC"
  stiTemp.sShortcut = "HIS"
  stiTemp.sName = "Histidin"
  stiTemp.sBestTriplett = "CAC"
5 Case "AGA", "AGG", "CGA", "CGU", "CGG", "CGC"
  stiTemp.sShortcut = "ARG"
  stiTemp.sName = "Arginin"
  stiTemp.sBestTriplett = "CGC"
  stiTemp.sSecondBest = "CGG"
10 Case "AAA", "AAG"
  stiTemp.sShortcut = "LYS"
  stiTemp.sName = "Lysin"
  stiTemp.sBestTriplett = "AAG"
Case "UAA", "UAG", "UGA"
15 stiTemp.sShortcut = "STP"
  stiTemp.sName = "Stop"
  stiTemp.sBestTriplett = "UGA"
  stiTemp.sSecondBest = "UAG"
End Select
20 Translation = stiTemp
Else 'Optimization for best frequency
  Select Case sTriplett
    Case "GGU", "GGC", "GGA", "GGG"
25 stiTemp.sShortcut = "GLY"
      stiTemp.sName = "Glycin"
      stiTemp.sBestTriplett = "GGC"
      stiTemp.sSecondBest = "GGU"
    Case "GCU", "GCC", "GCA", "GCG"
30 stiTemp.sShortcut = "ALA"
      stiTemp.sName = "Alanin"
      stiTemp.sBestTriplett = "GCC"
      stiTemp.sSecondBest = "GCU"
    Case "GUU", "GUC", "GUA", "GUG"
35 stiTemp.sShortcut = "VAL"
      stiTemp.sName = "Valin"
      stiTemp.sBestTriplett = "GUG"
      stiTemp.sSecondBest = "GUC"
    Case "UUA", "UUG", "CUU", "CUA", "CUG", "CUC"
40 stiTemp.sShortcut = "LEU"
      stiTemp.sName = "Leucin"
      stiTemp.sBestTriplett = "CUG"
      stiTemp.sSecondBest = "CUC"
    Case "AUA", "AUU", "AUC"
45 stiTemp.sShortcut = "ILE"
      stiTemp.sName = "Isoleucin"
      stiTemp.sBestTriplett = "AUC"
    Case "UUU", "UUC"
      stiTemp.sShortcut = "PHE"
```

```

    stiTemp.sName = "Phenylalanin"
    stiTemp.sBestTriplett = "UUC"
Case "UAU", "UAC"
    stiTemp.sShortcut = "TYR"
    stiTemp.sName = "Tyrosin"
    stiTemp.sBestTriplett = "UAC"
Case "UGG"
    stiTemp.sShortcut = "TRP"
    stiTemp.sName = "Tryptophan"
    stiTemp.sBestTriplett = "UGG"
Case "GAU", "GAC"
    stiTemp.sShortcut = "ASP"
    stiTemp.sName = "Asparaginsäure"
    stiTemp.sBestTriplett = "GAC"
Case "AAU", "AAC"
    stiTemp.sShortcut = "ASN"
    stiTemp.sName = "Asparagin"
    stiTemp.sBestTriplett = "AAC"
Case "GAA", "GAG"
    stiTemp.sShortcut = "GLU"
    stiTemp.sName = "Glutaminsäure"
    stiTemp.sBestTriplett = "GAG"
Case "CAA", "CAG"
    stiTemp.sShortcut = "GLN"
    stiTemp.sName = "Glutamin"
    stiTemp.sBestTriplett = "CAG"
Case "AGU", "AGC", "UCA", "UCU", "UCG", "UCC"
    stiTemp.sShortcut = "SER"
    stiTemp.sName = "Serin"
    stiTemp.sBestTriplett = "AGC"
    stiTemp.sSecondBest = "UCC"
    stiTemp.sThirdBest = "UCU"
Case "ACA", "ACU", "ACG", "ACC"
    stiTemp.sShortcut = "THR"
    stiTemp.sName = "Threonin"
    stiTemp.sBestTriplett = "ACC"
Case "UGU", "UGC"
    stiTemp.sShortcut = "CYS"
    stiTemp.sName = "Cystein"
    stiTemp.sBestTriplett = "UGC"
Case "AUG"
    stiTemp.sShortcut = "MET"
    stiTemp.sName = "Methionin"
    stiTemp.sBestTriplett = "AUG"
Case "CCA", "CCU", "CCG", "CCC"
    stiTemp.sShortcut = "PRO"
    stiTemp.sName = "Prolin"
    stiTemp.sBestTriplett = "CCC"

```

```

    stiTemp.sSecondBest = "CCU"
    Case "CAU", "CAC"
    stiTemp.sShortcut = "HIS"
    stiTemp.sName = "Histidin"
    stiTemp.sBestTriplet = "CAC"
    Case "AGA", "AGG", "CGA", "CGU", "CGG", "CGC"
    stiTemp.sShortcut = "ARG"
    stiTemp.sName = "Arginin"
    stiTemp.sBestTriplet = "CGC"
    stiTemp.sSecondBest = "AGG"
    Case "AAA", "AAG"
    stiTemp.sShortcut = "LYS"
    stiTemp.sName = "Lysin"
    stiTemp.sBestTriplet = "AAG"
    Case "UAA", "UAG", "UGA"
    stiTemp.sShortcut = "STP"
    stiTemp.sName = "Stop"
    stiTemp.sBestTriplet = "UGA"
    stiTemp.sSecondBest = "UAG"
    End Select
    Translation = stiTemp
End If

End Function

Public Function ReverseTranscription() As String
    Dim sTempCode As String
    Dim iLoop As Integer
    For iLoop = 0 To glAminoCounter - 1
    sTempCode = sTempCode + mastrAminoAcids(iLoop).sBestTriplet
    Next
    ReverseTranscription = sTempCode
End Function

Public Sub CountBases(ByVal sTempCode As String)

    Dim lLoop As Long
    Dim sFormattedCode As String
    Dim sActualBase As String
    Dim lCodeLength As Long

    lCodeLength = Len(sTempCode)
    For lLoop = 1 To CLng(lCodeLength)
    sActualBase = Mid(sTempCode, lLoop, 1)
    Select Case sActualBase
    Case "A", "a"
        glOptAdenin = glOptAdenin + 1
    Case "U", "u", "T", "t"

```

42

```
        glOptThymin = glOptThymin + 1
    Case "G", "g"
        glOptGuanin = glOptGuanin + 1
    Case "C", "c"
/5      glOptCytosin = glOptCytosin + 1
    End Select
Next ILoop
End Sub
```

10

```
Name: basPublics.bas
Code:
Attribute VB_Name = "basPublics"
15 Option Explicit

Public gsOriginalCode As String
Public gsFormattedCode As String
Public glCodeLength As Long
20
Public glAminoCounter As Long
Public glAdenin As Long
Public glThymin As Long
Public glGuanin As Long
25 Public glCytosin As Long
Public glOptAdenin As Long
Public glOptThymin As Long
Public glOptGuanin As Long
Public glOptCytosin As Long
30
Public gbSequenceChanged As Boolean
```

35 Name: mdiMain.frm

```
Code:
VERSION 5.00
Object = "{38911DA0-E448-11D0-84A3-00DD01104159}# 1.1# 0"; "COMCT332.OCX"
Begin VB.MDIForm mdiMain
40   BackColor    = &H00FFFFFF&
   Caption      = "Curevac_RNA_Analyzer"
   ClientHeight = 8745
   ClientLeft   = 165
   ClientTop    = 735
45   ClientWidth  = 12255
   Icon         = "mdiMain.frx":0000
   LinkTopic    = "MDIForm1"
   Picture      = "mdiMain.frx":058A
```

```
StartUpPosition = 3 'Windows Default
WindowState = 2 'Maximized
Begin ComCtl3.CoolBar cbarMain
  Align = 1 'Align Top
  Height = 885
  Left = 0
  TabIndex = 0
  Top = 0
  Width = 12255
  _ExtentX = 21616
  _ExtentY = 1561
  BandCount = 1
  BandBorders = 0 'False
  _CBWidth = 12255
  _CBHeight = 885
  _Version = "6.7.8988"
  MinHeight1 = 825
  Width1 = 4995
  FixedBackground1 = 0 'False
  NewRow1 = 0 'False
Begin VB.OptionButton optKindOfOptimize
  Caption = "Best Frequency"
  Height = 255
  Index = 1
  Left = 4920
  TabIndex = 7
  Top = 480
  Value = -1 'True
  Width = 1575
End
Begin VB.OptionButton optKindOfOptimize
  Caption = "Best GC"
  Height = 255
  Index = 0
  Left = 4920
  TabIndex = 6
  Top = 120
  Width = 1575
End
Begin VB.CommandButton cmdShowInput
  Caption = "Input"
  Height = 765
  Left = 0
  Picture = "mdiMain.frx":0C2A
  Style = 1 'Graphical
  TabIndex = 5
  Top = 0
  Width = 840
```

```
End
Begin VB.CommandButton cmdShowOptions
  Caption      = "Options"
  Enabled      = 0 'False
  Height       = 760
  Left         = 3480
  Picture      = "mdiMain.frx":0F34
  Style        = 1 'Graphical
  TabIndex     = 4
  Top          = 0
  Width       = 735
End
Begin VB.CommandButton cmdShowStatistics
  Caption      = "Statistics"
  Enabled      = 0 'False
  Height       = 760
  Left         = 2640
  Picture      = "mdiMain.frx":131E
  Style        = 1 'Graphical
  TabIndex     = 3
  Top          = 0
  Width       = 735
End
Begin VB.CommandButton cmdShowDisplay
  Caption      = "Display"
  Enabled      = 0 'False
  Height       = 760
  Left         = 1800
  Picture      = "mdiMain.frx":1628
  Style        = 1 'Graphical
  TabIndex     = 2
  Top          = 0
  Width       = 735
End
Begin VB.CommandButton cmdShowOutput
  Caption      = "Output"
  Enabled      = 0 'False
  Height       = 760
  Left         = 960
  Picture      = "mdiMain.frx":20E2
  Style        = 1 'Graphical
  TabIndex     = 1
  Top          = 0
  Width       = 735
End
End
Begin VB.Menu mnuMain
  Caption      = "&Input..."
```

```
Index      = 0
End
Begin VB.Menu mnuMain
Caption    = "&Results"
Index     = 1
Begin VB.Menu mnuResults
Caption    = "&Output..."
Enabled   = 0 'False
Index     = 0
10 End
Begin VB.Menu mnuResults
Caption    = "&Display..."
Enabled   = 0 'False
Index     = 1
15 End
Begin VB.Menu mnuResults
Caption    = "&Statistics..."
Enabled   = 0 'False
Index     = 2
20 End
End
Begin VB.Menu mnuMain
Caption    = "E&xtras"
Index     = 4
25 Begin VB.Menu mnuExtras
Caption    = "&Language"
Index     = 0
Begin VB.Menu mnuLanguage
Caption    = "English"
30 Checked  = -1 'True
Index     = 0
End
Begin VB.Menu mnuLanguage
Caption    = "&German"
35 Enabled  = 0 'False
Index     = 1
End
Begin VB.Menu mnuLanguage
Caption    = "&French"
40 Enabled  = 0 'False
Index     = 2
End
End
Begin VB.Menu mnuExtras
Caption    = "&Options..."
45 Enabled  = 0 'False
Index     = 1
End
```

```
Begin VB.Menu mnuExtras
  Caption   = "-"
  Index     = 2
End
5 Begin VB.Menu mnuExtras
  Caption   = "&About"
  Index     = 3
End
End
10 Begin VB.Menu mnuMain
  Caption   = "&Windows"
  Index     = 5
  WindowList = -1 True
  Begin VB.Menu mnuWindows
15   Caption   = "Tile &Horizontally"
     Index     = 0
  End
  Begin VB.Menu mnuWindows
20   Caption   = "Tile &Vertically"
     Index     = 1
  End
  Begin VB.Menu mnuWindows
     Caption   = "&Cascade"
     Index     = 2
25   End
  End
  Begin VB.Menu mnuMain
30   Caption   = "&Exit"
     Index     = 6
  End
End
End
Attribute VB_Name = "mdiMain"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = False
35 Attribute VB_PredeclaredId = True
Attribute VB_Exposed = False
Option Explicit

Private Sub cmdShowDisplay_Click()
40   Call frmDisplay.Show
End Sub

Private Sub cmdShowInput_Click()
   Call frmInput.Show
45 End Sub

Private Sub cmdShowOptions_Click()
   Call frmOptions.Show
```



```
End Sub

Private Sub cmdShowOutput_Click()
  Call frmOutPut.Show
5 End Sub

Private Sub cmdShowStatistics_Click()
  Call frmStatistics.Show
End Sub
10

Private Sub MDIForm_Load()
  Call InitControls
  Call frmInput.Show
End Sub
15

Private Sub InitControls()

  Dim lNextLeft As Long
  Const lSpace As Long = 60
20 Const lButtonWidth As Long = 850
  Const lButtonHeight As Long = 770

  lNextLeft = lSpace + lButtonWidth

25 With cmdShowInput
  .Top = lSpace
  .Left = lSpace
  .Width = lButtonWidth
  .Height = lButtonHeight
30 End With

  With cmdShowOutput
  .Top = lSpace
  .Left = lNextLeft + lSpace
35 .Width = lButtonWidth
  .Height = lButtonHeight
  End With

  With cmdShowDisplay
40 .Top = lSpace
  .Left = lNextLeft * 2 + lSpace
  .Width = lButtonWidth
  .Height = lButtonHeight
  End With
45

  With cmdShowStatistics
  .Top = lSpace
  .Left = lNextLeft * 3 + lSpace
```

```
.Width = lButtonWidth
.Height = lButtonHeight
End With

5 With cmdShowOptions
    .Top = lSpace
    .Left = lNextLeft * 4 + lSpace
    .Width = lButtonWidth
    .Height = lButtonHeight
10 End With

    cbarMain.Height = lButtonHeight + 2 * lSpace

15 End Sub

Private Sub mnuMain_Click(Index As Integer)

    Select Case Index
20     Case 0
        Call frmInput.Show
    Case 6
        Unload Me
    End Select
25 End Sub

Private Sub mnuResults_Click(Index As Integer)

30     Select Case Index
        Case 0 'Output
            Call frmOutPut.Show
        Case 1
            Call frmDisplay.Show
35     Case 2 'Statistische Auswertung
            Call frmStatistics.Show
    End Select

    End Sub

40 Private Sub mnuExtras_Click(Index As Integer)

    Select Case Index
45     Case 0 'Output
        '
    Case 1
        Call frmDisplay.Show
    Case 3
```

```
    Call frmAbout.Show(vbModal)
End Select
```

```
End Sub
```

5

```
Private Sub mnuWindows_Click(Index As Integer)
```

```
    Select Case Index
10      Case 0 'Horizontal
        Me.Arrange (vbTileHorizontal)
        Case 1 'Vertikal
        Me.Arrange (vbTileVertical)
        Case 2 'Kaskadieren
15      Me.Arrange (vbCascade)
    End Select
```

```
End Sub
```

20

```
Name: frmInput.frm
```

```
Code:
```

```
VERSION 5.00
```

```
Object = "{F9043C88-F6F2-101A-A3C9-08002B2F49FB}# 1.2# 0"; "COMDLG32.OCX"
25 Object = "{3B7C8863-D78F-101B-B9B5-04021C009402}# 1.2# 0"; "RICHTEX32.OCX"
```

```
Begin VB.Form frmInput
```

```
    Caption      = "Input"
    ClientHeight = 5730
    ClientLeft   = 60
30    ClientTop    = 345
    ClientWidth  = 13200
    Icon         = "frmInput.frx":0000
    LinkTopic    = "Form1"
    MDIChild     = -1 'True
35    ScaleHeight = 5730
    ScaleWidth   = 13200
    WindowState  = 2 'Maximized
Begin RichTextLib.RichTextBox txtFormatted
40    Height      = 1815
    Left         = 120
    TabIndex     = 3
    Top          = 360
    Width        = 12735
    _ExtentX     = 22463
45    _ExtentY     = 3201
    _Version     = 393217
    _BorderStyle = 0
    Enabled      = -1 'True
```

```
ScrollBars = 2
DisableNoScroll = -1 True
TextRTF = $"frmInput.frx":030A
BeginProperty Font {0BE35203-8F91-11CE-9DE3-00AA004BB851}
  Name = "Fixedsys"
  Size = 9
  Charset = 0
  Weight = 400
  Underline = 0 False
  Italic = 0 False
  Strikethrough = 0 False
EndProperty
End
Begin VB.OptionButton optSequence
  Caption = "Formatted"
  Height = 255
  Index = 1
  Left = 2760
  Style = 1 'Graphical
  TabIndex = 2
  Top = 0
  Value = -1 True
  Width = 855
End
Begin VB.OptionButton optSequence
  Caption = "Original"
  Height = 255
  Index = 0
  Left = 1920
  Style = 1 'Graphical
  TabIndex = 1
  Top = 0
  Width = 855
End
Begin VB.CommandButton cmdLoad
  Caption = "Load Sequence"
  Height = 285
  Left = 0
  TabIndex = 0
  Top = 0
  Width = 1695
End
Begin MSComDlg.CommonDialog CommonDialog1
  Left = 3840
  Top = -120
  _ExtentX = 847
  _ExtentY = 847
  _Version = 393216
```

```
End
End
Attribute VB_Name = "frmInput"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
5 Attribute VB_Creatable = False
Attribute VB_PredeclaredId = True
Attribute VB_Exposed = False
Option Explicit

10 Private Sub Form_Activate()
    Me.ZOrder
    Call InitControls
End Sub

15 Public Sub LoadSequence()

    Dim sFile As String
    Dim sTempCode As String

20     On Error GoTo ErrorHandler
    With CommonDialog1
        .FileName = App.Path & "\SampleRNA.txt"
        .CancelError = True
25     Call .ShowOpen
    End With
    If Len(CommonDialog1.FileName) > 0 Then
        gbSequenceChanged = True
        gsFormattedCode = ""
30     gsOriginalCode = ""
        sFile = CommonDialog1.FileName
        Open sFile For Input As # 1
        Input # 1, gsOriginalCode
        Close # 1
35     Call FormatText
        Call FillSequence

        mdiMain.cmdShowDisplay.Enabled = True
        mdiMain.cmdShowOutput.Enabled = True
40     mdiMain.cmdShowStatistics.Enabled = True
    End If

    Exit Sub

45 ErrorHandler:

    Dim lAnswer As Long
```

```
    If Err.Number <> cdlCancel Then
        lAnswer = MsgBox("Datei konnte nicht geladen werden", vbRetryCancel, "Dateiproblem")
        If lAnswer = vbRetry Then
            Resume
        End If
    End If

End Sub

10 Private Sub FormatText()

    Dim iLoop As Integer
    Dim sActualBase As String

15     glCodeLength = Len(gsOriginalCode)
    For iLoop = 0 To glCodeLength - 1
        sActualBase = Mid(gsOriginalCode, iLoop + 1, 1)
        If iLoop Mod 3 = 0 Then
20             gsFormattedCode = gsFormattedCode + " "
            glAminoCounter = glAminoCounter + 1
        End If
        Select Case sActualBase
            Case "A", "a"
25                 gsFormattedCode = gsFormattedCode + "A"
                    glAdenin = glAdenin + 1
            Case "U", "u", "T", "t"
                    gsFormattedCode = gsFormattedCode + "U"
                    glThymin = glThymin + 1
30             Case "G", "g"
                    gsFormattedCode = gsFormattedCode + "G"
                    glGuanin = glGuanin + 1
            Case "C", "c"
35                 gsFormattedCode = gsFormattedCode + "C"
                    glCytosin = glCytosin + 1
        End Select
    Next iLoop
    gsFormattedCode = Trim(gsFormattedCode)

40 End Sub

Private Sub FillSequence()
    If optSequence(0).Value = True Then
        txtFormatted.Text = gsOriginalCode
45     Else
        txtFormatted.Text = gsFormattedCode
    End If
```

End Sub

Private Sub cmdShowOutput_Click()

Call frmOutPut.Show

5 End Sub

Private Sub cmdLoad_Click()

Call LoadSequence

End Sub

10

Private Sub InitControls()

Const lSpace As Long = 40

Const lButtonHeight As Long = 285

15

With cmdLoad

.Top = lSpace

.Height = lButtonHeight

.Left = lSpace

20

End With

With optSequence(0)

.Top = lSpace

.Height = lButtonHeight

25

.Left = cmdLoad.Left + cmdLoad.Width + lSpace + 200

End With

With optSequence(1)

.Top = lSpace

30

.Height = lButtonHeight

.Left = optSequence(0).Left + optSequence(0).Width

End With

With txtFormatted

35

.Top = cmdLoad.Height + 2 * lSpace

.Left = lSpace

.Width = Me.ScaleWidth

.Height = Me.ScaleHeight - txtFormatted.Top

End With

40

End Sub

Private Sub optSequence_Click(Index As Integer)

Call FillSequence

End Sub

45

Name: frmOutPut.frm

Code:

VERSION 5.00

Object = "{3B7C8863-D78F-101B-B9B5-04021C009402}# 1.2# 0"; "RICHITX32.OCX"

Begin VB.Form frmOutPut

```
5   Caption      = "OutPut"
   ClientHeight = 9120
   ClientLeft   = 60
   ClientTop    = 345
   ClientWidth  = 10215
10  Icon         = "frmOutPut.frx":0000
   LinkTopic    = "Form1"
   MDIChild     = -1 'True
   ScaleHeight  = 9120
   ScaleWidth   = 10215
15  Begin RichTextLib.RichTextBox txtOptimized
   Height       = 2655
   Left        = 0
   TabIndex    = 0
   Top         = 480
20  Width       = 9855
   _ExtentX    = 17383
   _ExtentY    = 4683
   _Version    = 393217
   _Enabled    = -1 'True
25  ScrollBars  = 2
   DisableNoScroll = -1 'True
   TextRTF     = $"frmOutPut.frx":0442
   BeginProperty Font {0BE35203-8F91-11CE-9DE3-00AA004BB851}
30     Name      = "Fixedsys"
   Size       = 9
   Charset    = 0
   Weight     = 400
   Underline  = 0 'False
   Italic     = 0 'False
35  Strikethrough = 0 'False
   EndProperty
   End
   End
   Attribute VB_Name = "frmOutPut"
40  Attribute VB_GlobalNameSpace = False
   Attribute VB_Creatable = False
   Attribute VB_PredeclaredId = True
   Attribute VB_Exposed = False
   Option Explicit
45  Private Sub Form_Activate()
```

Me.ZOrder


```
Call InitControls
If gbSequenceChanged = True Then
    Call BuildAminoChain(gsFormattedCode, False)
End If
5 gbSequenceChanged = False
  txtOptimized.Text = LCase(ReverseTranscription)

End Sub

10 Private Sub InitControls()

Const lSpace As Long = 40

15 With txtOptimized
    .Top = lSpace
    .Left = lSpace
    .Width = Me.ScaleWidth + lSpace
    .Height = Me.ScaleHeight + lSpace
20 End With
End Sub

25 Name: frmDisplay.frm
Code:
VERSION 5.00
Object = "*\ACurevac_Genetic_Controls.vbp"
Begin VB.Form frmDisplay
30 Caption = "Display"
ClientHeight = 8205
ClientLeft = 60
ClientTop = 345
ClientWidth = 8745
35 Icon = "frmDisplay.frx":0000
LinkTopic = "Form1"
MDIChild = -1 'True
ScaleHeight = 8205
ScaleWidth = 8745
40 ShowInTaskbar = 0 'False
Begin VB.OptionButton optNucleotids
Caption = "Original"
Height = 255
Index = 0
45 Left = 0
Style = 1 'Graphical
TabIndex = 1
Top = 0
```

```
        Width      = 855
    End
    Begin VB.OptionButton optNucleotids
    5      Caption     = "Optimized"
        Height     = 255
        Index      = 1
        Left       = 840
        Style      = 1 'Graphical
        TabIndex   = 0
    10     Top        = 0
        Value      = -1 'True
        Width      = 855
    End
    Begin Curevac_Genetic_Controls.Curevac_Amino Curevac_Amino1
    15     Height     = 495
        Index      = 0
        Left       = 240
        Top        = 360
        Visible    = 0 'False
    20     Width      = 735
        _ExtentX   = 1296
        _ExtentY   = 873
    End
    End
    25 Attribute VB_Name = "frmDisplay"
        Attribute VB_GlobalNameSpace = False
        Attribute VB_Creatable = False
        Attribute VB_PredeclaredId = True
        Attribute VB_Exposed = False
    30 Option Explicit

    Private Sub Form_Activate()

        Me.ZOrder
    35     If gbSequenceChanged = True Then
            Call BuildAminoChain(gsFormattedCode, True)
        End If
        gbSequenceChanged = False

    40 End Sub

    Private Sub optNucleotids_Click(Index As Integer)

    45     Dim bShowOriginal As Boolean

        If Index = 0 Then 'Original Clicked
            bShowOriginal = True
```

```
Else 'Optimized Clicked
  bShowOriginal = False
End If
Call RebuildChain(bShowOriginal)
5
End Sub

10 Name: frmStatistics.frm
Code:
VERSION 5.00
Begin VB.Form frmStatistics
  Caption      = "Statistics"
15  ClientHeight = 6450
  ClientLeft   = 60
  ClientTop    = 345
  ClientWidth  = 8595
  Icon         = "frmStatistics.frx":0000
20  LinkTopic   = "Form1"
  MDIChild     = -1 'True
  ScaleHeight  = 6450
  ScaleWidth   = 8595
  Begin VB.Frame Frame1
25    Caption    = "original"
    Height     = 2655
    Left       = 120
    TabIndex   = 9
    Top        = 720
30    Width      = 2175
    Begin VB.Label lblAdenin
      BorderStyle = 1 'Fixed Single
      Height     = 495
      Left       = 840
35      TabIndex   = 17
      Top        = 240
      Width      = 1215
    End
    Begin VB.Label lblCytosin
40      BorderStyle = 1 'Fixed Single
      Height     = 495
      Left       = 840
      TabIndex   = 16
      Top        = 2040
45      Width      = 1215
    End
    Begin VB.Label lblGuanin
      BorderStyle = 1 'Fixed Single
```

```

    Height      = 495
    Left        = 840
    TabIndex    = 15
    Top         = 1440
5    Width      = 1215
End
Begin VB.Label lblThymin
    BorderStyle = 1 Fixed Single
10    Height     = 495
    Left        = 840
    TabIndex    = 14
    Top         = 840
    Width      = 1215
End
15    Begin VB.Label Label14
        Caption   = "Cytosin"
        Height    = 255
        Left      = 120
        TabIndex  = 13
20    Top        = 2160
        Width     = 615
    End
    Begin VB.Label Label2
25    Caption   = "Thymin"
        Height    = 255
        Left      = 120
        TabIndex  = 12
        Top        = 960
        Width     = 615
30    End
    Begin VB.Label Label3
        Caption   = "Guanin"
        Height    = 255
        Left      = 120
35    TabIndex  = 11
        Top        = 1560
        Width     = 615
    End
    Begin VB.Label Label1
40    Caption   = "Adenin"
        Height    = 255
        Left      = 120
        TabIndex  = 10
        Top        = 360
45    Width     = 615
    End
End
Begin VB.Frame Frame2
```

```

Caption      = "optimized"
Height       = 2655
Left         = 2520
TabIndex    = 0
5 Top        = 720
Width       = 2175
Begin VB.Label Label4
Caption      = "Adenin"
10 Height    = 255
Left        = 120
TabIndex    = 8
Top         = 360
Width      = 615
End
15 Begin VB.Label Label6
Caption      = "Cytosin"
Height      = 255
Left        = 120
20 TabIndex  = 7
Top         = 2160
Width      = 615
End
Begin VB.Label Label8
25 Caption   = "Guanin"
Height     = 255
Left       = 120
TabIndex   = 6
Top        = 1560
Width     = 615
30 End
Begin VB.Label Label12
Caption     = "Thymin"
35 Height   = 255
Left       = 120
TabIndex   = 5
Top        = 960
Width     = 615
End
40 Begin VB.Label lblOptAdenin
BorderStyle = 1 Fixed Single
Height     = 495
Left       = 840
TabIndex   = 4
Top        = 240
45 Width   = 1215
End
Begin VB.Label lblOptThymin
BorderStyle = 1 Fixed Single
```

```

    Height    = 495
    Left      = 840
    TabIndex  = 3
    Top       = 840
5    Width    = 1215
End
Begin VB.Label lblOptGuanin
    BorderStyle = 1 'Fixed Single
    Height      = 495
10   Left      = 840
    TabIndex    = 2
    Top         = 1440
    Width       = 1215
End
15   Begin VB.Label lblOptCytosin
    BorderStyle = 1 'Fixed Single
    Height      = 495
    Left        = 840
    TabIndex    = 1
20   Top       = 2040
    Width       = 1215
End
End
Begin VB.Label lblBases
25   BorderStyle = 1 'Fixed Single
    Height      = 495
    Left        = 1320
    TabIndex    = 19
    Top         = 120
30   Width     = 1215
End
Begin VB.Label Label5
    Caption     = "Sum of bases"
35   Height    = 255
    Left       = 120
    TabIndex   = 18
    Top        = 240
    Width      = 1095
End
40 End
Attribute VB_Name = "frmStatistics"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = False
Attribute VB_PredeclaredId = True
45 Attribute VB_Exposed = False
Option Explicit

Private Sub Form_Activate()
```

```
Me.ZOrder

lblBases.Caption = CStr(glAminoCounter * 3)
5  lblAdenin.Caption = CStr(glAdenin)
   lblThymin.Caption = CStr(glThymin)
   lblGuanin.Caption = CStr(glGuanin)
   lblCytosin.Caption = CStr(glCytosin)

10  Call CountBases(frmOutPut.txtOptimized.Text)
   lblOptAdenin.Caption = CStr(glOptAdenin)
   lblOptThymin.Caption = CStr(glOptThymin)
   lblOptGuanin.Caption = CStr(glOptGuanin)
   lblOptCytosin.Caption = CStr(glOptCytosin)
15  End Sub

20  Name: frmOptions.frm
   Code:
   VERSION 5.00
   Begin VB.Form frmOptions
     Caption      = "Options"
25  ClientHeight = 3915
     ClientLeft   = 60
     ClientTop    = 345
     ClientWidth  = 5760
     Icon         = "frmOptions.frx":0000
30  LinkTopic    = "Form1"
     MDIChild     = -1 'True
     ScaleHeight  = 3915
     ScaleWidth   = 5760
   End
35  Attribute VB_Name = "frmOptions"
   Attribute VB_GlobalNameSpace = False
   Attribute VB_Creatable = False
   Attribute VB_PredeclaredId = True
   Attribute VB_Exposed = False
40  Option Explicit

   Name: frmAbout.frm
45  Code:
   VERSION 5.00
   Begin VB.Form frmAbout
     BorderStyle  = 3 'Fixed Dialog
```

```
Caption      = "About Curevac RNA-Analyzer"
ClientHeight = 2490
ClientLeft   = 2340
ClientTop    = 1935
5 ClientWidth = 6195
ClipControls = 0 'False
LinkTopic    = "Form2"
MaxButton    = 0 'False
MinButton    = 0 'False
10 ScaleHeight = 1718.642
ScaleMode    = 0 'User
ScaleWidth   = 5817.425
ShowInTaskbar = 0 'False
Begin VB.PictureBox picIcon
15   AutoSize    = -1 'True
      ClipControls = 0 'False
      Height     = 1215
      Left       = 120
      Picture     = "frmAbout.frx":0000
20   ScaleHeight = 811.195
      ScaleMode  = 0 'User
      ScaleWidth  = 2401.98
      TabIndex   = 1
      Top        = 120
25   Width      = 3480
End
Begin VB.CommandButton cmdOK
      Cancel     = -1 'True
30   Caption    = "OK"
      Default    = -1 'True
      Height     = 345
      Left       = 2520
      TabIndex   = 0
      Top        = 2040
35   Width      = 1260
End
Begin VB.Label lblCompany
      Caption    = "lblCompany"
40   Height     = 255
      Left       = 3720
      TabIndex   = 5
      Top        = 1200
      Width      = 2295
End
45 Begin VB.Line Line1
      BorderColor = &H00808080&
      BorderStyle = 6 'Inside Solid
      Index      = 1
```



```
X1      = 112.686
X2      = 5746.996
Y1      = 1325.218
Y2      = 1325.218
5  End
Begin VB.Label lblDescription
Caption  = "App Description"
ForeColor = &H00000000&
Height  = 330
10  Left   = 120
TabIndex = 2
Top     = 1560
Width   = 5925
End
15  Begin VB.Label lblTitle
Caption  = "Application Title"
ForeColor = &H00000000&
Height  = 360
Left    = 3720
20  TabIndex = 3
Top     = 240
Width   = 2325
End
Begin VB.Line Line1
25  BorderColor = &H00FFFFFF&
BorderWidth  = 2
Index       = 0
X1          = 112.686
X2          = 5746.996
30  Y1          = 1325.218
Y2          = 1325.218
End
Begin VB.Label lblVersion
35  Caption  = "Version"
Height  = 225
Left    = 3720
TabIndex = 4
Top     = 720
Width   = 2325
40  End
End
Attribute VB_Name = "frmAbout"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = False
45  Attribute VB_PredeclaredId = True
Attribute VB_Exposed = False
Option Explicit
```

```
Private Sub cmdOK_Click()  
    Unload Me  
End Sub
```

5

```
Private Sub Form_Load()  
    Me.Caption = "About " & App.Title  
    lblVersion.Caption = "Version " & App.Major & "." & App.Minor & "." & App.Revision  
    lblTitle.Caption = App.Title  
10    lblDescription.Caption = App.FileDescription  
    lblCompany.Caption = App.CompanyName  
End Sub
```

Patentansprüche

- 5 1. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens eine modifizierte mRNA, die für mindestens ein biologisch wirksames oder antigenes Peptid oder Polypeptid codiert, in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Vehikel, dadurch gekennzeichnet, dass
- 10 - der G/C-Gehalt des für das Peptid oder Polypeptid codierenden Bereichs der modifizierten mRNA größer als der G/C-Gehalt des codierenden Bereichs der für das Peptid oder Polypeptid codierenden Wildtyp-mRNA ist und die codierte Aminosäuresequenz gegenüber dem Wildtyp unverändert ist und/oder
- 15 - der für das Peptid oder Polypeptid codierende Bereich der modifizierten mRNA gegenüber dem für das Peptid oder Polypeptid codierenden Bereich der Wildtyp-mRNA derart verändert ist, dass mindestens ein Codon der Wildtyp-Sequenz, das für eine in der Zelle relativ seltene tRNA codiert, gegen ein Codon ausgetauscht ist, das für eine in der Zelle relativ häufige tRNA codiert, welche die gleiche Aminosäure trägt wie die relativ seltene
- 20 tRNA.
2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der G/C-Gehalt des für das Peptid oder Polypeptid codierenden Bereichs der modifizierten mRNA um mindestens 15%-Punkte größer als der
- 25 G/C-Gehalt des codierenden Bereichs der für das Peptid oder Polypeptid codierenden Wildtyp-mRNA ist.
3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass alle Codons der Wildtyp-Sequenz, die für eine in der Zelle relativ seltene tRNA codieren, jeweils gegen ein Codon ausgetauscht sind, das für eine in der Zelle relativ häufige tRNA codiert, welche jeweils die gleiche Aminosäure trägt wie die relativ seltene tRNA.
- 30

4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der für das Peptid oder Polypeptid codierende Bereich der modifizierten mRNA verändert ist, dass sich ein maximaler G/C-Gehalt in Verbindung mit den Codons ergibt, die für relative häufige tRNAs codieren.
5
5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der für das Peptid oder Polypeptid codierende Bereich und/oder der 5'- und/oder der 3'-nicht-translatierte Bereich der modifizierten mRNA gegenüber der Wildtyp-mRNA derart verändert ist, dass er keine destabilisierenden Sequenzelemente aufweist.
10
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die modifizierte mRNA eine 5'-Cap-Struktur und/oder einen polyA-Schwanz von mindestens 70 Nucleotiden und/oder eine IRES und/oder eine 5'-Stabilisierungssequenz und/oder eine 3'-Stabilisierungssequenz aufweist.
15
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die modifizierte mRNA mindestens ein Analoges natürlich vorkommender Nucleotide aufweist.
20
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Analoge aus der Gruppe, bestehend aus Phosphorthioaten, Phosphoramidaten, Peptidnucleotiden, Methylphosphonaten, 7-Deazaguanosin, 5-Methylcytosin und Inosin, ausgewählt ist.
25
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid aus der Gruppe, bestehend aus Wachstumsfaktoren, Tumorantigenen, Antigenen von Viren, Bakterien und Protozoen, ausgewählt ist.
30

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das virale, bakterielle oder protozoologische Antigen aus einem sekretierten Protein stammt.
- 5 11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ein Polyepitop von Tumorantigenen, viralen, bakteriellen oder protozoologischen Antigenen ist.
- 10 12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die mRNA zusätzlich für mindestens ein Cytokin codiert.
- 15 13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, welche weiter mindestens ein Cytokin enthält.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Impfung gegen Infektionskrankheiten und Krebs.
- 20 15. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Geweberegeneration.

Fig. 1A

Influenza-Matrix: Wildtyp-Gen (zum Vergleich)

agatctaaagatgagtccttctaaccgaggtcgaaacgtacgttctctcta
 tcatcccgtcaggccccctcaaagccgagatcgcacagagacttgaagat
 gtctttgcaggaagaacaccgatcttgaggttctcatggaatggctaaa
 gacaagaccaatcctgtcacctctgactaaggggattttaggatttgtgt
 tcacgctcaccgtgccagtgagcggactgcagcgtagacgctttgtc
 caaatgcccttaatgggaacggggatccaaataacatggacaaagcagt
 taaactgtataggaagctcaagagggagataacattccatggggccaaag
 aatctcactcagttattctgctgggtgcacttgccagttgtatggcctc
 atatacaacaggatgggggctgtgaccactgaagtggcatttggcctggt
 atgtgcaacctgtgaacagattgctgactcccagcatcggctctcataggc
 aatggtgacaacaaccaaccactaatcagacatgagaacagaatggtt
 ttagccagcactacagctaaggctatggagcaaattggctggatcgagtga
 gcaagcagcagaggccatggagggttgctagtcaggctaggcaaattggtgc
 aagcgatgagaaccattgggactcatcctagctccagtgctggtctgaaa
 aatgatcttcttgaaaatttgaggcctatcagaaacgaatgggggtgca
 gatgcaacggttcaagtgaactag

Fig. 1B

Influenza-Matrix: Proteinsequenz

MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKTRP
 ILSPLTKGILGFVFTLTVPSEGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDKAVKLY
 RCLKREITFHGAKEISLSYSAGALASCMGLIYNRMGAVTTEVAFGLVCAT
 CEQIADSQHRSHRQMVTTTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAA
 EAMEVASQARQMVQAMRTIGTHPSSAGLKNLDLENLQAYQKRMGVQMR
 FK*

Fig. 1C

Influenza-Matrix: Gen mit erhöhtem G/C-Gehalt

agatcctaaagat**g**agCctGctGaccgaggtGgaGacCtacgtGctGAGCa
 tcatcccCAGCggccccctGaaGgccgagatcgcCcagagGctGgaGgaC
 gtGttCgcCggCaagaacaccgaCctGgaggtGctGatggaGtggctGaa
 gacCagGccCatacctgAGCccCctgacCaagggCatCCTGggCttCgtgt
 tcacCctGaccgtgcccagCgagcgCggCctgcagcgCCGCcgcttCgtG
 caGaaCgccctGaaCggCaacggCgaCccCaaCaacatggacaaGgcCgt
 GaaGctgtaCaggaagctGaagagggagatCacCttccaCggCgcaaGg
 aGatcAGCctGagCtaCAGCgcCggCgcCctGgccagCtgCatgggcctG
 atCtacaacaggatgggCgcCgtgaccacCgaGgtggcCttCggcctgg
 GtgCgcCacctgCgaGcagatCgcCgacAGCagcaCcgCAGCcaCaggc
 aGatgggtgacCacCaccaaccccCctGatcagGcaCgagaacagGatgggtG
 CTGgccagcacCacCgcCaagggCatggagcaGatggcCggCAGCaGCga
 gcaGgcCgcCgaggccatggaggtGgcCagCagggCaggcaGatgggtgc
 aGgcCatgagGaccatCggCacCcaCccCagcAGCagCgcCggCctgaaG
 aaCgaCctGctGgaGaaCCTGcaggcctaCcagaaGcgCatgggCgtgca
 gatgcaGcgCttcaag**tga**actagt

Fig. 1D

Influenza-Matrix: Gen für sekretierte Form (mit N-terminaler Signalsequenz) mit erhöhtem G/C-Gehalt

Agatcctaaagat**g**GCCGTCATGGCCCCCGCACCCCTGGTGCTGCTGCTGA
 GCGGCGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCTagCctGctGaccgaggtG
 gaGacCtacgtGctGAGCatcatcccCAGCggccccctGaaGgccgagat
 cgcCcagagGctGgaGgaCgtGttCgcCggCaagaacaccgaCctGgagg
 tGctGatggaGtggctGaagacCagGccCatacctgAGCccCctgacCaag
 ggCatCCTGggCttCgtgttcacCctGaccgtgcccagCgagcgCggCct
 gcagcgCCGCcgcttCgtGcaGaaCgccctGaaCggCaacggCgaCccCa
 aCaacatggacaaGgcCgtGaaGctgtaCaggaagctGaagagggagatC
 acCttccaCggCgcaaGgaGatcAGCctGagCtaCAGCgcCggCgcCct
 GgccagCtgCatgggcctGatCtacaacaggatgggCgcCgtgaccacCg
 aGgtggcCttCggcctggGtgCgcCacctgCgaGcagatCgcCgacAGC
 cagcaCcgCAGCcaCaggcaGatgggtgacCacCaccaaccccCctGatcag
 GcaCgagaacagGatgggtGCTGgccagcacCacCgcCaagggCatggagc
 aGatggcCggCAGCaGCgagcaGgcCgcCgaggccatggaggtGgcCagC
 caggcCaggcaGatgggtgcaGgcCatgagGaccatCggCacCcaCccCag
 cAGCagCgcCggCctgaaGaaCgaCctGctGgaGaaCCTGcaggcctaCc
 agaaGcgCatgggCgtgcagatgcaGcgCttcaag**tga**actagt

Fig. 1E

Influenza-Matrix: mRNA mit Stabilisierungssequenzen

GCUUGUUCUUUUUGCAGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCagauc
 uaaagauggagucucuaaaccgaggucgaaacguacguucucucuauc
 ccgucaggcccccucaaagccgagaucgcacagagacuugaagaugucuu
 ugcagggagaacaccgaucuuaggguucuauggaauggcuaaagaca
 gaccauuccugucaccucugacuaaggggauuuuaggauuuguguucacg
 cucaccgugcccagugagcggagacugcagcguagacgcuuuguccaaa
 ugcccuuaauggggaacggggauccaaauaacauggacaaagcaguuaaac
 uguauaggaagcucaagaggagauaacaauuccauggggccaaagaauc
 ucacucaguuaucugcuggugcacuugccaguuguauggggccucaua
 caacaggaugggggucugaccacugaaguggcauuuggccugguaugug
 caaccugugaacagauugcugacuccagcaucggucucuaaggcaaau
 gugacaacaaccaaccacuaaucagacaugagaacagaauugguuuagc
 cagcacuacagcuaaggcuauaggagcaauuggcuggaucgagugagcaag
 cagcagaggccauggagguugcuagucaggcuaggcaauuggugcaagcg
 augagaaccauugggacucauccuagcuccagugcuggucugaaaauga
 ucuucuugaaaauuugcaggccuaucaagaaacgaauggggggugcagaugc
 aacgguucaagugaACUAGUGACUGACUAGCCCCGUGGGCCUCCCAACGG
 GCCUCCUCCCUCCUUGCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA

Fig. 1F

Influenza-Matrix: mRNA mit erhöhtem G/C-Gehalt und Stabilisierungssequenzen

GCUUGUUCUUUUUGCAGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCagauc
 uaaagauggagCcuGcuGaccgagguGgaGacCuacguGcuGAGCaucauc
 ccCAGCggcccccuGaaGgcccagaucgcCagagGcuGgaGgaCguGuu
 CgcCggCaagaacaccgaCcuGgagguGcuGauggaGuggcuGaagacCa
 gGccCauccugAGCccCugacCaagggCauCCUGggCuuCguguuacC
 cuGaccgugcccagCgagcgCggCcuGcagcgCCGCcgcuuCguGcaGaa
 CgcccGaaCggCaacggCgaCccCaaCaacauggacaaGgcCguGaaGc
 uguaCaggaagcuGaagagggagauCacCuuccaCggCgcaaGgaGauc
 AGCcuGagCuaCAGCgcCggCgcCcuGgccagCugCaugggccuGauCua
 caacaggaugggCgcCgugaccacCgaGguggcCuuCggccugguGugCg
 cCaccugCgaGcagauCgcCgacAGCagcaCcgCAGCcaCaggcaGaug
 gugacCacCaccaaccCcuGaucagGcaCgagaacagGaugguGCUGgc
 cagcacCacCgcCaagggCauggagcaGauggcCggCAGCaGCgagcaGg
 cCgcCgaggccauggagguGgcCagCagggcCaggcaGauggugcaGgcC
 augagGaccuacggCacCcaCccCagcAGCagCgcCggCcuGaaGaaCga
 CcuGcuGgaGaaCCUGcaggccuaCagaaGcgCaugggCgugcagaugc
 aGcgCuucaagugaACUAGUGACUGACUAGCCCCGUGGGCCUCCCAACGG
 GCCUCCUCCCUCCUUGCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA

Fig. 2A

MAGE1: Wildtyp-Gen (zum Vergleich)

catcatgtctcttgagcagaggagtctgcactgcaagcctgaggaagccc
 ttgaggcccaacaagaggccctgggcctgggtgtgtgagcaggctgccacc
 tcctcctcctcctcctctggcctgggcaccctggaggaggtgccactgc
 tgggtcaacagatcctccccagagtcctcagggagcctccgccttccca
 ctaccatcaactcactcgacagaggcaaccagtgagggtccagcagc
 cgtgaagaggaggggccaagcacctcttgatcctggagtccttgttccg
 agcagtaatcactaagaaggtggctgatttggttggttttctgctcctca
 aatatcgagccaggagccagtcacaaaggcagaaatgctggagagtgctc
 atcaaaaattacaagcactgttttctgagatcttcggcaaagcctctga
 gtccttgacagctggtctttggcattgacgtgaaggaagcagaccccaccg
 gccactcctatgtccttgacacctgcctaggtctctcctatgatggcctg
 ctgggtgataatcagatcatgccaagacaggcttcctgataattgtcct
 ggtcatgattgcaatggagggcgccatgctcctgaggaggaaatctggg
 aggagctgagtgatggaggtgatgatgggaggagcagcagtgctat
 ggggagcccaggaagctgctcacccaagatttggtgcaggaaaagtacct
 ggagtaccggcaggtgccggacagtgatcccgcacgctatgagttcctgt
 ggggtccaagggccctcgctgaaaccagctatgtgaaagtccttgagtat
 gtgatcaaggtcagtgcaagagttcgctttttcttcccatccctgcgtga
 agcagctttgagagaggaggaagaggaggtctgagcatga

Fig. 2B

MAGE1: Proteinsequenz

SER, LEU, GLU, GLN, ARG, SER, LEU, HIS, CYS, LYS, PRO, GLU, GLU, ALA, LEU, GLU, ALA, GLN, GLN, GLU, ALA, LEU, GLY, LEU, VAL, CYS, VAL, GLN, ALA, ALA, THR, SER, SER, SER, SER, PRO, LEU, VAL, LEU, GLY, THR, LEU, GLU, GLU, VAL, PRO, THR, ALA, GLY, SER, THR, ASP, PRO, PRO, GLN, SER, PRO, GLN, GLY, ALA, SER, ALA, PHE, PRO, THR, THR, ILE, ASN, PHE, THR, ARG, GLN, ARG, GLN, PRO, SER, GLU, GLY, SER, SER, SER, ARG, GLU, GLU, GLU, GLY, PRO, SER, THR, SER, CYS, ILE, LEU, GLU, SER, LEU, PHE, ARG, ALA, VAL, ILE, THR, LYS, LYS, VAL, ALA, ASP, LEU, VAL, GLY, PHE, LEU, LEU, LEU, LYS, TYR, ARG, ALA, ARG, GLU, PRO, VAL, THR, LYS, ALA, GLU, MET, LEU, GLU, SER, VAL, ILE, LYS, ASN, TYR, LYS, HIS, CYS, PHE, PRO, GLU, ILE, PHE, GLY, LYS, ALA, SER, GLU, SER, LEU, GLN, LEU, VAL, PHE, GLY, ILE, ASP, VAL, LYS, GLU, ALA, ASP, PRO, THR, GLY, HIS, SER, TYR, VAL, LEU, VAL, THR, CYS, LEU, GLY, LEU, SER, TYR, ASP, GLY, LEU, LEU, GLY, ASP, ASN, GLN, ILE, MET, PRO, LYS, THR, GLY, PHE, LEU, ILE, ILE, VAL, LEU, VAL, MET, ILE, ALA, MET, GLU, GLY, GLY, HIS, ALA, PRO, GLU, GLU, GLU, ILE, TRP, GLU, GLU, LEU, SER, VAL, MET, GLU, VAL, TYR, ASP, GLY, ARG, GLU, HIS, SER, ALA, TYR, GLY, GLU, PRO, ARG, LYS, LEU, LEU, THR, GLN, ASP, LEU, VAL, GLN, GLU, LYS, TYR, LEU, GLU, TYR, ARG, GLN, VAL, PRO, ASP, SER, ASP, PRO, ALA, ARG, TYR, GLU, PHE, LEU, TRP, GLY, PRO, ARG, ALA, LEU, ALA, GLU, THR, SER, TYR, VAL, LYS, VAL, LEU, GLU, TYR, VAL, ILE, LYS, VAL, SER, ALA, ARG, VAL, ARG, PHE, PHE, PHE, PRO, SER, LEU, ARG, GLU, ALA, ALA, LEU, ARG, GLU, GLU, GLU, GLU, GLY, VAL, STP - , ALA, STP

Fig. 2C

MAGE1: mRNA mit erhöhtem G/C-Gehalt

augagccuggagcagcgcagccugcaacugcaagccggaggaggcgcuggaggcgcagcagga
ggcgcuggggccuggucugcguccaggcggcgacgagcagcagcagcccgcugguccugggca
cgcuggaggaggucccgacggcgggagcaacggaccccgccgagagcccgcagggcgcgagc
gcuucccgacgacgaucaacuucacgcgccagcggccagccgagcaggggagcagcagccg
cgaggaggaggcccagcagcagcugcauccuggagagccuguuccgcgcggucaucacga
agaaggucgcggaccuggucggcuuccugcugcugaaguaccgcgcgcgcgagccggucacg
aaggcggagaugcuggagagcgucaucaagaacuacaagcacugcuucccgagaucuucgg
caaggcagcagcagagccugcagcuggucuuucggcaucgacgucaaggaggcggacccgacgg
gccacagcuacguccuggucacgugccuggggccugagcuacgacggccugcuggggcgacaac
cagaucaugccgaagacgggcuuccugaucaucguccugguaucaugaucgcgauggaggcgg
ccacgcgccggaggaggagaucugggaggagcugagcgucauggaggucuaacgacggccgcg
agcacagcgcguacggcagccgcgcaagcugcugacgcaggaccugguccaggagaaguac
cuggaguaccgccaggucccgacagcagcccgccgcgcuacgaguuccuguggggcccgcg
cgcgcuggcggagacgagcuacgucaagguccuggaguacgucaucaaggucagcgcgcgcg
uccgcuucuuucccgagccugcgcgaggcggcgcugcgcgaggaggaggaggggcgcuguga
gcgugauga

Fig. 2D

MAGE1: mRNA mit alternativer Codonverwendung

augagccuggagcagcgcagccugcaacugcaagcccaggaggcccuggaggcccagcagga
ggcccuggggccuggugugcguccaggccgccaccagcagcagcagccccuggugcugggca
cccuggaggaggugcccaccgcccggcagcaccgacccccccagagccccaggggcgcagc
gccuuccccaccaccaucaacuucacccgccagcggccagcccagcaggggagcagcagccg
cgaggaggaggcccagcaccagcugcauccuggagagccuguuccgcgcggugaucacca
agaagguggggcaccuggugggcuuccugcugcugaaguaccgcgcccgcgagcccgugacc
aaggccgagaugcuggagagcgucaucaagaacuacaagcacugcuucccgagaucuucgg
caaggccagcagagccugcagcuggugucggcaucgacgugaaggaggccgaccccaccg
gccacagcuacgugcuggugaccugccuggggccugagcuacgacggccugcuggggcgacaac
cagaucaugcccaagaccggcuuccugaucaucgugcuggugaugaucgccauggaggcgg
ccacgcccccgaggaggagaucugggaggagcugagcgucauggagguguaacgacggccgcg
agcacagcgcguacggcagccccgcaagcugcugacccaggaccuggugcaggagaaguac
cuggaguaccgccaggugcccagcagcagcccgccgcgcuacgaguuccuguggggcccgcg
cgcccuggccgagaccagcuacgugaaggugcuggaguacgugaucaaggugagcgcgccgcg
ugcgcuuuuucccgagccugcgcgaggccgcccugcgcgaggaggaggaggaggggcguuga
gccugauga