

ARNm : vaccins ou thérapie génique? les enjeux de sécurité de la réglementation

Hélène Banoun

Chercheur indépendant, 13001 Marseille, France

Int. J. Mol. Sci. **2023**, *24*(13), 10514; <https://doi.org/10.3390/ijms241310514>

Reçu 9 Juin 2023 / Révisé: 19 Juin 2023 / Accepté : 21 Juin 2023 / Publié: 22 Juin 2023

(This article belongs to the Special Issue [The Future of Drug Discovery and Development](#))

Citation : Banoun, H. mRNA: Vaccine or Gene Therapy? The Safety Regulatory Issues. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10514. <https://doi.org/10.3390/ijms241310514>

Résumé : Les vaccins COVID-19 ont été développés et approuvés rapidement en réponse à l'urgence créée par la pandémie. Aucune réglementation spécifique n'existait au moment de leur mise sur le marché. Les agences réglementaires l'ont donc adaptée en fonction de l'urgence. Maintenant que l'urgence pandémique est passée, il est temps d'examiner les questions de sécurité associées à cette approbation rapide. Le mode d'action des vaccins à ARNm COVID-19 devrait les classer parmi les produits de thérapie génique, mais ils en ont été exclus par les agences réglementaires. Certains des tests auxquels ils ont été soumis en tant que vaccins ont donné des résultats non conformes en termes de pureté, de qualité et d'homogénéité des lots. La biodistribution large et persistante des ARNm et de leur produit protéique, incomplètement étudiés en raison de leur classification en tant que vaccins, soulève des questions de sécurité. Des études postérieures à la mise sur le marché ont montré que l'ARNm passe dans le lait maternel et pourrait avoir des effets néfastes sur les bébés allaités. L'expression à long terme, l'intégration dans le génome, la transmission à la lignée germinale, le passage dans le sperme, la toxicité embryo/fœtale et périnatale, la génotoxicité et la tumorigénicité devraient être étudiés à la lumière des effets indésirables signalés dans les bases de données de pharmacovigilance. La transmission horizontale potentielle (c'est-à-dire l'excrétion) devrait également avoir été évaluée. Une vaccinovigilance approfondie devrait être effectuée. Nous nous attendons à ce que ces contrôles soient exigés pour les futurs vaccins ARNm développés en dehors du contexte d'une pandémie.

1. Introduction

La réglementation des médicaments et des vaccins est un sujet méconnu mais très important. En effet, par principe, les produits de santé doivent être soumis à des contrôles très stricts afin de contrôler leur efficacité et leur profil de sécurité.

Les vaccins ARNm anti-COVID-19 sont les premiers vaccins ARNm commercialisés. Les vaccins ARNm, qui représentent une nouvelle classe de vaccins, devraient faire l'objet de plus de contrôles que les vaccins conventionnels car ils sont basés sur plusieurs nouvelles technologies [1]. Bien qu'incomplètement défini, le mode d'action des vaccins à ARNm [2] devrait les classer parmi les produits de thérapie génique (GTP gene therapy product) [3]. Cependant, les ARNm utilisés comme vaccins contre une maladie infectieuse ont été exclus de la réglementation des produits de thérapie génique par les réglementations des États-Unis et de l'Union européenne [4]. Aucune réglementation spécifique n'existait avant 2020 pour les vaccins à ARNm. "Les lignes directrices

actuelles ne s'appliquent pas, ne mentionnent pas les thérapies à base d'ARN ou n'ont pas de définition largement acceptée" [5]. Les organismes de réglementation ont donc dû adopter une procédure d'urgence pour contrôler les essais de ces produits, à savoir l'examen continu. Dans les examens continus, les données sont soumises et examinées au fur et à mesure qu'elles sont disponibles avant que l'ensemble des données ne soit disponible et que des contrôles spécifiques pour cette nouvelle plateforme n'aient été demandés [6].

L'objectif de cette étude est de comparer les contrôles exigés par la réglementation des GTP avec ceux effectivement appliqués aux vaccins à ARNm COVID-19. Certains des contrôles requis pour les GTP ne l'étaient pas pour les vaccins COVID-19 à ARNm, probablement en raison de l'urgence pandémique qui a nécessité le développement rapide de vaccins contre le SRAS-CoV-2. Les problèmes de sécurité potentiels découlant de l'absence de ces contrôles seront examinés. Ceci est d'autant plus urgent que les industriels envisagent de remplacer certains vaccins "classiques" par des vaccins ARNm [2], à commencer par les vaccins contre la grippe. En effet, Sanofi lance un essai clinique du premier candidat vaccin contre la grippe saisonnière à base d'ARNm [7] et Moderna a de nombreux vaccins à ARNm en essais cliniques (COVID-19, grippe, métapneumovirus humain, parainfluenzas, RSV, HCoV, CMV, EBV, HSV, varicelle, herpès, VIH, Zika, Nipah), en particulier un essai de phase 3 pour le vaccin contre la grippe [8]. Un essai clinique de phase 1 est en cours pour un vaccin antigrippal à ARNm-LNP [9]. Pour ces vaccins anti-grippe, l'approbation d'urgence ne devrait pas s'appliquer et l'exigence de ces études supplémentaires ne devrait pas être dépassée.

En outre des « vaccins » contre le cancer sont annoncés (par exemple, Moderna et Merck sont partenaires dans les essais du mRNA-4157/V940, un "vaccin" anti-mélanome combiné avec Keytruda - un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de la mort cellulaire programmée, PD-1) qui agit en renforçant la capacité du système immunitaire du corps à détecter et à combattre les cellules tumorales, en bloquant l'interaction entre PD-1 et ses ligands, PD-L1 et PD-L2, activant ainsi la réponse des cellules anti-T, en particulier la réponse antitumorale [10]).

Il faut être très vigilant sur le terme de vaccin associé aux médicaments thérapeutiques, notamment en ce qui concerne la réglementation qui leur est applicable. Ces thérapeutiques ne sont pas des vaccins contre les maladies infectieuses et doivent donc continuer à respecter la réglementation des GTP.

2. Réglementation actuelle des ARNm anti-COVID-19

2.1. Le mode d'action des ARNm anti-COVID-19 les définit comme des GTP et les destine à devenir des vaccins.

Bien qu'incomplètement défini, le mode d'action des vaccins ARNm devrait les classer parmi les produits de thérapie génique (GTP) [2] ; il s'agit d'acides nucléiques destinés à faire produire un antigène par les cellules du vacciné, induisant la production d'anticorps.

Ce mode d'action correspond exactement à la définition d'un GTP par les agences réglementaires.

Selon le rapport CHMP de l'EMA (Commission des médicaments à usage humain) [11], la substance active consiste en un ARNm qui est traduit en antigène (la protéine spike du SRAS-CoV-2) : *"La substance active consiste en un ARNm qui est traduit en protéine antigène du SARS-CoV-2 ; les nanoparticules lipidiques (LNP) protègent l'ARN et permettent la transfection des cellules hôtes après l'administration IM ; la protéine S induit une réponse immunitaire adaptative"*.

Selon la FDA [12], la thérapie génique est une intervention médicale basée sur la modification du matériel génétique des cellules vivantes. Les cellules peuvent être modifiées in vivo par une thérapie génique administrée directement au sujet.

Selon l'EMA 2009 [13], un GTP : (a) *contient une substance active qui contient ou consiste en un acide nucléique recombinant utilisé ou administré à des êtres humains en vue de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique ; et (b) dans ses effets thérapeutiques, prophylactiques ou diagnostiques, se rapporte directement à la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient, ou au produit de l'expression génétique de cette séquence.*

Mais l'ARNm correspond aussi à la définition d'un vaccin ; il y a cependant une incompatibilité jusqu'à un certain point.

Les lignes directrices de l'OMS de 2005 [14] accordent aux vaccins à base d'acides nucléiques le statut de vaccins ("antigènes produits in vivo chez l'hôte vacciné après administration d'un vecteur vivant ou d'un acide nucléique ou antigènes produits par synthèse chimique in vitro").

Selon la définition de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament, Saint-Denis, France) [15], un vaccin est un médicament préventif composé d'une ou plusieurs substances actives d'origine biologique appelées antigènes, administré pour protéger contre une maladie.

Selon le CDC [16], un vaccin est une préparation utilisée pour stimuler la réponse immunitaire de l'organisme contre les maladies.

Selon la réglementation européenne, les vaccins sont des produits capables de produire une immunité active [17] et contiennent des antigènes capables d'induire une immunité active contre un agent infectieux [4]. Selon l'EMA [11], la substance active du vaccin COVID-19 Pfizer est l'ARNm : ce n'est pas un antigène. Par conséquent, selon les pharmacopées européenne et française, les ARNm ne doivent pas être considérés comme des vaccins car ils ne contiennent pas d'antigènes.

De plus, toujours selon leur mode d'action, les vaccins ARNm peuvent être considérés comme des pro-vaccins ; il s'agit d'un néologisme calqué sur le mot pro-médicament (ou pro-drogue) qui désigne un médicament qui, après administration, est transformé par

l'organisme en un médicament pharmacologiquement actif. En effet, selon le principe de l'ARNm, celui-ci doit être traduit en protéine par les cellules de la personne vaccinée (la substance injectée n'est pas la substance provoquant une immunisation active). Selon la FDA [18], les vaccins à ARNm correspondent au Type IA des pro-drogues, qui sont des substances converties par les cellules en médicaments actifs. Cette propriété de pro-drogue pourrait impliquer des contrôles supplémentaires à ceux appliqués aux vaccins. Cependant, ni la FDA ni l'EMA ne font référence à ces qualifications pour les vaccins anti-COVID-19 à ARNm.

2.2. Les ARNm utilisés comme vaccins contre les maladies infectieuses ont été exclus de la réglementation des GTP par les réglementations des États-Unis et de l'UE

En 1998, la FDA indiquait déjà que l'ADN recombinant utilisé pour transférer du matériel génétique utilisé comme vaccin préventif n'est pas couvert par le règlement pour la thérapie génique [12]. En 2007, la FDA a distingué les vaccins à ADN plasmidique selon qu'ils étaient destinés à la prophylaxie d'une maladie infectieuse ou non ; les ADN plasmidiques sans indication dans les maladies infectieuses étaient soumis à la réglementation des produits de thérapie génique, tandis que les vaccins à ADN plasmidique contre les maladies infectieuses faisaient l'objet d'une réglementation distincte inspirée de celle des GTP [19]. En 2013, la FDA a confirmé que la réglementation des produits de thérapie génique ne s'appliquait pas aux vaccins contre les maladies infectieuses [20]. Dans un document de 1996 [21] sur les plasmides ADN pour des indications préventives de maladies infectieuses, il est précisé (comme pour toutes les règlements de la FDA) qu'aucune exigence ultérieure n'a été établie : il s'agissait de recommandations non contraignantes. C'est pourquoi cette étude se fondera principalement sur les documents de l'EMA ; bien que les règlements l'EMA ne soient pas juridiquement contraignantes, les demandeurs doivent justifier tout écart.

Selon l'EMA, depuis 2009, "*les médicaments de thérapie génique ne doivent pas inclure les vaccins contre les maladies infectieuses*" [13]. Cette exclusion a été confirmée en 2015 [22]. Pour un historique de la réglementation des acides nucléiques pour la prévention des maladies infectieuses, voir le tableau 1.

Cette exclusion pose un problème logique car tous les produits à base d'ARN n'ont pas le même statut réglementaire, comme l'ont souligné Guerriaud et Kohli [4].

2.3. Il est nécessaire de souligner les contradictions de la législation

Selon la législation de l'Union européenne (UE), les médicaments à base d'ARN peuvent actuellement être classés dans différents statuts réglementaires, en fonction, pour les vaccins, de leur cible (maladie infectieuse ou non) et, pour les autres médicaments, de leur mode d'obtention (chimique ou biologique) [4]. Cette classification détermine les contrôles et les études à réaliser pour obtenir les autorisations de mise sur le marché. Ainsi, les vaccins ARNm contre les maladies infectieuses ne sont pas classés comme des produits de thérapie génique [17] (p. 162) et [22] alors que les vaccins ARNm pour le traitement des cancers sont des GTP (médicaments de thérapie génique, qui font partie des ATMP, médicaments thérapeutiques avancés) ; en effet, les ARNm sont des GTP,

selon le CAT (Committee for Advanced Therapies), et doivent donc faire l'objet d'études pharmacocinétiques complètes [24].

Year	Regulatory agency	Rule	Comment
1996	FDA [22] Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications	Plasmid DNA vaccines are defined as purified preparations of plasmid DNA designed to contain a gene or genes for the intended vaccine antigen as well as genes incorporated into the construct to allow for production in a suitable host system.	No mention of RNA because RNA-based gene therapy was not yet envisaged
1998	FDA [12] content current as of 2021 Guidance for human cell therapy and gene therapy	Virus or DNA preparations used as preventive vaccines are not covered by this document, though there is some overlap in the issues	No mention of RNA because RNA-based gene therapy was not yet envisaged
2003	European Union Directive 2001/83/EC which regulates medicinal products for human use, amended in June 2003 Part IV relating to Advanced Medicinal Products (ATMPs) https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32003L0063&qid=1686154511801	Gene Therapy Medicinal Products (GTMPs) are defined as: "a product obtained through a set of manufacturing processes aimed at the transfer, to be performed either in vivo or ex vivo, of a prophylactic, diagnostic or therapeutic gene (i.e. a piece of nucleic acid), to human/animal cells and its subsequent expression in vivo;"	Specific GTMPs included « naked nucleic acid » This definition would include mRNA vaccines
2005	WHO [33]	WHO grant nucleic-acid based vaccines the status of vaccines	Vaccines must comply with GMP In case of new formulations : distribution studies and toxicology studies for new additive are required
2007	FDA [20]	Manufacturing issues and preclinical required studies for DNA plasmids as vaccine to prevent infectious diseases	DNA plasmids are subject to controls inspired by those for GTP
2009	European Union Directive 2001/83/EC Part IV on ATMPs amended 14 September 2009 [13]	A GTP <i>(a) contains an active substance which contains or consists of a recombinant nucleic acid used in or administered to human beings with a view to regulating, repairing, replacing, adding or deleting a genetic sequence; and</i> <i>(b) its therapeutic, prophylactic or diagnostic effect relates directly to the recombinant nucleic acid sequence it contains, or to the product of genetic expression of this sequence.</i> <i>Gene therapy medicinal products shall not include vaccines against infectious diseases.</i>	Vaccines against infectious diseases are excluded from the GTP regulations No ethical or scientific justification is provided
2013	FDA [21]	Regulation of gene therapy products did not apply to vaccines against infectious diseases	Apply to DNA plasmids

Year	Regulatory agency	Rule	Comment
2015	EMA [24] Reflection Paper on Classification of Advanced Therapy Medicinal Products	EMA confirms that vaccines against infectious diseases are not classified as gene therapy products	No ethical or scientific justification is provided
2016	EMA [28]	EMA specifies in this document that the non-clinical specific aspects of nucleic acid vaccines must be studied in the light of GTP regulations	Does not include mRNAs but the definition provided is not exhaustive

Table 1 : History of gene therapy vs vaccine regulation

Il est donc surprenant que Moderna et BioNTech s'attendaient à ce que leurs produits soient réglementés en tant que thérapies géniques. Moderna, Inc. a reconnu dans sa déclaration à la Securities and Exchange Commission (SEC) du deuxième trimestre 2020 que *"actuellement, l'ARNm est considéré comme un produit de thérapie génique par la FDA"* [26]. En outre, le fondateur de BioNTech, Ugur Sahin, a déclaré dans un article de 2014 : *»On s'attendrait à ce qu'un médicament à base d'ARNm soit classé parmi les produits biologiques, les thérapies géniques ou les thérapies cellulaires somatiques"* [27]. Ainsi, le statut des vaccins à ARNm COVID-19 n'a pas été bien compris par les fabricants eux-mêmes.

Le règlement de l'EMA doit se référer à la directive de l'OMS sur l'évaluation non clinique des vaccins. Selon l'EMA, *"contrairement à la directive de l'UE, la directive de l'OMS inclut également les vaccins contenant un vecteur vivant ou un acide nucléique. Ceci est considéré comme approprié car de nombreux aspects non cliniques à traiter sont communs aux vaccins traditionnels et aux vaccins contenant un vecteur vivant ou de l'ADN libre"*. Ceci est en contradiction avec l'exclusion des vaccins à acide nucléique de la réglementation GTP, puisque l'EMA précise dans le même document de 2016 que les aspects spécifiques des vaccins à acide nucléique doivent être étudiés à la lumière de la réglementation GTP [28].

En 2020, l'OMS a constaté le manque de clarté de la réglementation régissant les vaccins à ARNm. Pour résoudre ce problème réglementaire, l'OMS a publié le 20 décembre 2020 un projet de document d'orientation pour l'évaluation de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité des vaccins à ARNm, qui comprend la fabrication et le contrôle des vaccins ainsi que leur évaluation non clinique. L'OMS a admis que des informations détaillées n'étaient pas disponibles pour la production des vaccins à ARNm COVID-19. En outre, les contrôles de sécurité et d'efficacité des produits biologiques à base de gènes n'étaient pas normalisés, et certains détails restaient exclusifs et n'étaient pas divulgués au public. Compte tenu de ces incertitudes, l'OMS a estimé qu'il n'était pas possible d'élaborer des lignes directrices ou des recommandations internationales spécifiques et qu'une certaine souplesse réglementaire était nécessaire [25].

2.4. Pourquoi les vaccins à ARNm sont-ils exclus de la réglementation des produits de thérapie génique ?

Selon Guerriaud et Kohli [4], « *il est difficile de répondre avec certitude à la question de savoir pourquoi les vaccins contre les maladies infectieuses ont été exclus. La définition [des vaccins] n'a pas changé depuis 1975, époque à laquelle il n'existait pas de "vaccin" contre le cancer* » [17] ; ce sont des agents capables de produire une immunité active contre une maladie infectieuse. À l'époque, les seuls vaccins existants étaient contre les maladies infectieuses et la définition actuelle d'un vaccin se limite à un médicament immunologique contre une maladie infectieuse. Par conséquent, un médicament anticancéreux ne peut en aucun cas être qualifié de "vaccin". Il convient de noter que les vaccins thérapeutiques contre le SIDA, basés sur des lentivirus et agissant comme des thérapies géniques, parce qu'ils s'intègrent dans le génome, ont également été exclus des thérapies géniques [29]. On peut supposer que le demandeur a fait valoir que le produit a un mode d'action à la fois thérapeutique et prophylactique, mais le document n'est pas disponible sur le site web de l'EMA.

D'un point de vue de santé publique, et sachant que les ARNm anti-COVID-19 considérés comme des vaccins n'ont pas fait l'objet de tous les contrôles stricts requis pour les GTP (voir ci-dessous), on pourrait objecter qu'un produit destiné à la majorité de la population mondiale en bonne santé devrait être soumis à une réglementation plus stricte qu'un GTP destiné à quelques rares personnes souffrant d'une maladie rare ou d'un cancer (concernant cette fois-ci des millions de personnes). De plus, selon l'EMA [28], *"Comme les vaccins sont dans la plupart des cas administrés à un grand nombre d'individus en bonne santé, il est nécessaire de procéder à une solide évaluation non clinique de la sécurité"*.

Cette exclusion pourrait avoir une explication réglementaire ; cette décision a été prise en partie parce que les vaccins ont un mécanisme d'action très différent de celui des autres médicaments et en partie pour s'assurer que tous les vaccins sont examinés par le même comité (The Committee for Medicinal Products for Human Use-CHMP), les experts en vaccins de l'EMA (The Scientific Advisory Group on Vaccines (SAG-V) [30]) et le groupe de travail sur les vaccins (Vaccines Working Party) [31].

2.5. Contrôles requis pour les ARNm considérés comme des vaccins

Les vaccins, en général, font partie des médicaments humains selon l'EMA et doivent donc subir les contrôles relatifs à ces produits ; la réglementation d'un médicament concerne les bonnes pratiques de fabrication (BPF). Ces BPF sont détaillées dans le document de l'EMA de 2001, mis à jour en 2012, qui s'applique à tous les médicaments humains y compris les vaccins [17] (p. 117). Ces BPF concernent, entre autres et pour les études précliniques, l'évaluation des risques environnementaux, la caractérisation du produit et des matières premières (pureté et qualité), leur contrôle et leur stabilité, les méthodes de fabrication, les études pharmacologiques (ex, composition quantitative, description du procédé de fabrication, matières premières non répertoriées dans une pharmacopée, identification et dosage de la substance active, mode d'action, test

d'activité biologique in vitro ou in vivo - si le dosage dans le produit fini n'est pas possible - toxicité, cancérogénicité, toxicité pour la reproduction et pour l'embryon/le fœtus, pharmacocinétique, pharmacodynamie - modification de la physiologie par le médicament - efficacité et sécurité du produit). Pour un nouvel excipient, les informations chimiques, pharmaceutiques et biologiques doivent être identiques à celles fournies pour la substance active [17] (p. 135). L'OMS recommande le même type de contrôles pour les vaccins en général [14].

Les BPF concernant la qualité, la pureté et la stabilité des produits, les méthodes de fabrication, la toxicité pour la reproduction et l'embryon/le fœtus et la cancérogénicité seront examinées ci-dessous. Bien que ces BPF s'appliquent à tous les médicaments humains, elles ne s'appliquent généralement pas aux vaccins.

La pharmacocinétique est l'action de l'organisme sur un médicament, c'est-à-dire le devenir du médicament, de son entrée à sa sortie de l'organisme, l'évolution dans le temps de son absorption, de sa biodisponibilité, de sa distribution, de son métabolisme et de son excrétion [17]. *"Les études pharmacocinétiques ne sont généralement pas nécessaires pour les vaccins. Cependant, de telles études peuvent s'appliquer lorsque de nouveaux systèmes d'administration sont utilisés ou lorsque le vaccin contient de nouveaux adjuvants ou excipients"* [11].

Selon un document de 2016 [28], pour l'EMA, la réglementation devrait suivre celle de l'OMS. Les lignes directrices de l'OMS [14] précisent qu'une étude pharmacodynamique peut également s'étendre à la pharmacologie d'un adjuvant et que des études de distribution doivent être envisagées dans le cas de nouvelles formulations. Lorsqu'un nouvel additif doit être utilisé, pour lequel des données toxicologiques ne sont pas disponibles, des études de toxicité de l'additif seul doivent d'abord être réalisées et les résultats doivent être documentés conformément aux lignes directrices relatives aux nouvelles entités chimiques.

L'EMA exige également des études supplémentaires pour les vaccins utilisant une nouvelle formulation ; un document de 2006, applicable aux "vaccins ADN exprimant des antigènes étrangers", indique que "les études pharmacocinétiques ne sont généralement pas nécessaires pour les vaccins. Cependant, de telles études peuvent s'appliquer lorsque de nouveaux systèmes d'administration sont utilisés ou lorsque le vaccin contient de nouveaux adjuvants ou excipients" [23]. Ce document a été rédigé avant l'exclusion des vaccins à acide nucléique contre les maladies infectieuses de la réglementation GTP. Nous verrons plus loin que les études pharmacocinétiques fournies pour les ARNm anti-COVID-19 sont incomplètes.

2.6. Contrôles requis en tant que pro-drogue

La FDA [18] souligne les problèmes particuliers des pro-drogues posés par leur conversion plus ou moins complète en substance active et la question de la toxicité. Selon la FDA, il est nécessaire de définir comment la pro-drogue contribue de manière significative au profil de toxicité de la drogue active, notamment en fonction du site de transformation et d'action. Pour les vaccins ARNm, la transformation biologique se

produit dans de nombreux types de cellules et dans tous les organes (voir ci-dessous), alors que le but recherché, c'est-à-dire l'immunisation, ne se produira que dans les cellules immunitaires. Toutefois, les vaccins ARNm ne sont pas considérés comme des pro-médicaments et ne doivent donc pas être soumis aux contrôles concernant le site de transformation et d'action.

2.7. Contrôles supplémentaires fondés sur les règlements des GTP

Compte tenu de l'urgence pandémique, le processus d'examen des vaccins a été modifié et accéléré sous la forme d'un examen continu. Dans ce type d'examen, les données sont soumises et examinées au fur et à mesure qu'elles sont disponibles, avant que l'ensemble des données ne soit disponible. Cette approche nécessite une collaboration plus étroite et une interaction plus intense entre le promoteur et l'autorité sanitaire [6]. On peut déduire des rapports de l'EMA que celle-ci a adapté la réglementation sur les vaccins et exigé certains contrôles spécifiques aux produits de thérapie génique. C'est ce qui ressort de l'analyse des EPARs pour Moderna [32] et de la rolling review pour Pfizer [11,33,34].

Malgré l'absence de réglementation spécifique pour les vaccins ARNm, l'EMA a ajouté les contrôles suivants sur la qualité du produit : identité (par séquençage RT-Sanger pour Spikevax et séquençage de nouvelle génération pour Comirnaty) ; teneur en ARN total (UV), pureté (RP- HPLC) ; impuretés liées au produit (RP-HPLC) ; % 5' Capped (RP-UPLC) ; % PolyA tailed RNA (RP-HPLC pour Spikevax, pas entièrement décrit pour Comirnaty) et matrice d'ADN résiduelle (qPCR).

Cependant, certaines obligations spécifiques signalées dans le premier rapport (par exemple, le mode d'action, qui n'est pas décrit) [11,33,34] n'ont pas été remplies selon le rapport 2021 [35]. En ce qui concerne les impuretés, la méthode de détermination de l'endotoxine bactérienne doit être précisée [11,33,34]. Les niveaux d'endotoxine trouvés ne sont pas spécifiés dans les documents de l'autorité réglementaire australienne, la TGA, et certains lots étaient encore en cours d'évaluation au moment de la libération des lots [36]. La limite acceptée est de 12,5 EU/mL [34].

En ce qui concerne la qualité du produit, la méthode de transcription in vitro n'est pas suffisamment décrite et la caractérisation de l'ARNm n'est pas satisfaisante ; les méthodes d'évaluation des ARNm tronqués et modifiés doivent être plus détaillées. Un test de puissance n'est pas satisfaisant, le test d'expression in vitro doit être mis à jour. Si la longueur et le pourcentage de la queue Poly(A) restent partiellement inchangés, la REC20 [recommandation] n'est pas remplie. Si des données de stabilité de 3 mois sont fournies, des données de 6 mois sont attendues [36] et la présence d'ARNm tronqués et l'expression de protéines tronquées ne sont pas suffisamment explorées [33]. L'EMA demande une clarification du mode d'action [11,33,34].

Par conséquent, les résultats des contrôles requis pour les GTP demandés par l'EMA ne sont pas suffisants selon les rapports de l'EMA.

3. Contrôles requis par la réglementation du GTP auxquels les ARNm anti-COVID-19 n'ont pas été soumis

3.1. Qualité des produits

En ce qui concerne la qualité du produit, les GTP sont soumis à des contrôles spécifiques qui ne sont pas mentionnés pour les médicaments non génétiques [37,38]. Parmi ces contrôles, le taux d'endotoxines n'a pas été fourni numériquement (voir ci-dessus) et l'interaction des acides nucléiques avec le vecteur n'a pas été étudiée.

La présence/absence de caractéristiques spécifiques, telles que les séquences CpG, doit être confirmée par des méthodes appropriées : cela n'a pas été fait. La recherche et la quantification des impuretés liées au produit (séquences supprimées, réarrangées, hybrides ou mutées, oxydation, dépolymérisation) ne sont pas fournies. L'utilisation de gènes de résistance aux antibiotiques dans le GTP final devrait être évitée si possible et, si ce n'est pas possible, justifiée (ceci n'a pas été justifié). *"Si cela est inévitable, des études doivent être réalisées avant les premières études cliniques sur l'expression involontaire de gènes de résistance dans les cellules somatiques humaines"* [37] ; ces études n'ont pas été réalisées.

Concernant l'US-FDA, il faut se référer au guide du CBER (Center for Biologics Evaluation and Research) en charge de la régulation de ces produits, qui n'émet que des recommandations non contraignantes [39], ainsi qu'aux instructions de 2013 [20], qui imposent globalement les mêmes critères que l'EMA.

3.2. Pharmacocinétique

Selon l'UE, les GTP nécessitent des tests ou des essais spécifiques pour évaluer le risque d'intégration génomique et de transmission germinale [24,38], même si cette intégration est improbable [37], comme c'est le cas pour l'ARN.

Les GTP nécessitent des tests ou des essais spécifiques pour évaluer le risque de mutagenèse insertionnelle, de tumorigénicité, de toxicité embryonnaire/fœtale et périnatale et d'expression à long terme [38], ce qui n'a pas été fait.

Pour les GTP, l'EMA exige des études approfondies à la fois sur l'acide nucléique et sur la particule vectrice/système de délivrance qui comprennent la biodistribution, l'étude de la dose, la toxicité cible potentielle, l'identification de l'organe cible pour obtenir une activité biologique, la toxicité liée à l'expression de protéines structurellement modifiées, la toxicité pour la reproduction (pour ces études, les tests doivent suivre le document ICH M3 [40]), la toxicité répétée et l'excrétion dans l'environnement. Ces études sont requises pour les produits contenant de l'ADN car le document a été rédigé en 2006 [37] et les vaccins à ARNm n'étaient pas envisagés à l'époque. La toxicité répétée n'a pas été étudiée de manière adéquate car seules deux doses de vaccin étaient prévues [32].

Il est nécessaire d'insister sur les études pharmacocinétiques, qui ne sont généralement pas requises pour les vaccins, sauf s'ils sont basés sur une nouvelle formulation ou si le

vaccin contient de nouveaux adjuvants ou excipients. La nécessité de ces études doit être évaluée au cas par cas par les autorités réglementaires [23]. En outre, "les études standard d'absorption/distribution/métabolisme et d'excrétion pour les médicaments conventionnels peuvent ne pas être pertinentes pour les GTP" [38]. Par exemple, la voie d'administration considérée comme le pire scénario (par exemple, la voie intraveineuse, qui représente l'effet d'une diffusion à grande échelle du GTP) doit être prise en compte. Pour les GTP, on attend des études sur l'excrétion et la dissémination dans l'organisme, y compris des études sur la persistance, l'élimination et la mobilisation. Les études de biodistribution doivent également porter sur les études pharmacocinétiques du produit transgénique (par exemple, les protéines exprimées). Les études fournies par les fabricants semblent incomplètes de ce point de vue (voir section 4).

3.3. Contrôles des médicaments biologiques non effectués

L'EMA, comme la Commission européenne, considère que les "*produits dérivés de l'ARN doivent être considérés comme des produits biologiques, même s'ils ne sont pas dérivés d'une source biologique*" [41]. Selon la réglementation européenne [17], pour un médicament biologique, une liste d'activités biologiques doit être fournie, et des études sur la fonction de reproduction, la toxicité embryo-fœtale et périnatale et le potentiel mutagène et cancérogène doivent être envisagées. Nous avons vu plus haut que ces tests n'ont pas été effectués et que les activités biologiques du principe actif - l'ARN - n'ont pas été suffisamment décrites.

3.4. Études cliniques

Les études d'élimination (par sécrétion et excrétion) dans les modèles animaux doivent être utilisées pour estimer la probabilité et l'étendue de l'excrétion chez l'homme et pour guider la conception des études cliniques d'excrétion. Des études pharmacocinétiques cliniques doivent être incluses si le produit génique est une protéine excrétée dans la circulation sanguine. Le potentiel de transmission à des tiers doit être étudié, ou une justification pour ne pas le faire doit être fournie. L'effet dose-réponse doit être évalué. L'excrétion dans le liquide séminal doit également être abordée pour le GTP ; il n'y a aucune mention de cette excrétion possible dans les rapports des agences de réglementation.

Les questions de génotoxicité, y compris la mutagenèse insertionnelle et la tumorigénicité qui en découle, doivent être évaluées avec soin dans des modèles in vitro/ in vivo pertinents. La suppression immunitaire, un facteur causal de la tumorigénicité chez l'homme, doit être étudiée. Selon l'EPAR de Spikevax, aucune étude de cancérogénicité, de mutagenèse insertionnelle ou de tumorigénicité in vivo n'a été soumise. Des études de toxicité embryo-fœtale et périnatale peuvent être nécessaires si des femmes en âge de procréer doivent être exposées à des GTP [38].

3.5. Vaccinovigilance

Selon l'EMA, les GTP ont l'obligation de fournir des données sur la sécurité et l'efficacité pendant 30 ans après la date de péremption du médicament, ce qui va au-delà des exigences de la pharmacovigilance classique [24].

Selon la réglementation de la FDA relative aux GTP [42], un suivi à long terme des événements indésirables doit être effectué pendant au moins 5 ans pour les nouvelles maladies cliniques, telles que : nouvelle(s) tumeur(s) maligne(s), nouvelle incidence ou exacerbation d'un trouble neurologique préexistant, nouvelle incidence ou exacerbation d'un trouble rhumatologique ou d'un autre trouble auto-immun antérieur, nouvelle incidence d'un trouble hématologique et nouvelle incidence d'une infection (potentiellement liée au produit).

Selon le règlement européen [13], une stratégie de suivi à long terme de la sécurité et de l'efficacité doit être incluse dans le plan de gestion des risques.

En ce qui concerne les vaccins conventionnels, la durée d'observation des effets indésirables n'est généralement que de quelques semaines. La Brighton Collaboration [43], chargée de surveiller les profils de sécurité et les rapports bénéfiques/risques des vaccins, a publié un guide pour la surveillance des effets indésirables sélectionnés des vaccins en général. Les durées de suivi sont parfois précisées mais dépassent rarement 2 mois [44] et, selon une étude de pharmacovigilance du vaccin COVID-19 de la FDA [45], les personnes vaccinées sont suivies jusqu'à 42 jours.

4. Discussion

4.1. Contrôles requis pour une pro-drogue qui n'ont pas été effectués

Si les ARNm anti-COVID-19 avaient été classés comme pro-drogues, ils auraient dû subir des contrôles concernant le site de transformation et d'action [18]. Il aurait ainsi été détecté que la protéine spike traduite à partir de l'ARNm ne se trouve pas uniquement dans les cellules immunitaires du muscle où l'ARNm est injecté. Ce point sera discuté plus loin dans la section pharmacocinétique.

4.2. Les résultats de certains tests requis pour les vaccins en général ne sont pas satisfaisants

4.2.1. Pureté de la substance médicamenteuse

Il ne s'agit pas ici de discuter des résultats des contrôles de l'ARNm, mais il semble important de le faire uniquement en ce qui concerne la pureté du produit. L'EMA exige une pureté de 95 % pour les produits à usage humain [17] ; selon l'EMA [11], la pureté du produit final de Pfizer varie en fonction du processus de fabrication. Selon le "Rapporteur Rolling Review critical assessment report" obtenu par FOIA [34] (pp. 81 et 102), qui détaille le document précédent, la pureté du produit est bien inférieure à 95% au moment de la mise sur le marché et le critère d'acceptation est de 50%. Dans un autre document obtenu par FOIA, ce seuil est de 58% pour les ARNm [35] (p. 38). Dans le

rapport 2022 pour le vaccin Moderna adapté à la souche Omicron, l'EMA demande à nouveau de réévaluer la nécessité d'ajuster les limites de spécification de pureté au niveau de la substance active [46]. Ces défauts de pureté du produit sont discutables pour une nouvelle formulation.

Il convient de noter que la procédure de libération des lots menée par l'OCABR [47] n'a pas détecté d'hétérogénéité des lots. Le document fourni par l'OCABR ne précise pas les contrôles effectués par les laboratoires de référence concernant l'identité, la puissance et l'intégrité du produit. Cependant, une hétérogénéité dans la toxicité des lots a été publiée qui pourrait résulter d'une hétérogénéité de composition [48].

4.2.2. Impuretés dans la substance médicamenteuse

La limite pour les quantités résiduelles de la matrice d'ADN était basée sur la recommandation de l'OMS : pas plus de 10 ng d'ADN par dose [49]. Cette limite avait été fixée en 1985 par la FDA à 10 pg par dose de vaccin, et relevée par l'OMS en 1986 à 100 pg par dose, puis à 10 ng par dose en 1996.

L'OMS a souligné que le nombre total de doses à administrer devait être pris en compte lors de l'utilisation de cette limite. Sur la base de ces considérations, et en supposant une dose maximale de 30 µg, le critère d'acceptation commerciale à la libération [des lots] est ≤ 330 ng d'ADN/mg d'ARN [33] (p. 103). Cependant, l'EMA demande des informations supplémentaires sur le modèle d'ADN linéaire et la méthode de quantification.

Dans le rapport de l'EMA [33], les résultats des tests portant sur la matrice d'ADN résiduelle et l'ARNdb [double-brin] étaient très hétérogènes d'un lot à l'autre, bien que nettement inférieurs aux limites acceptées. Il serait judicieux de réévaluer les méthodes de dosage et les limites pour les futurs vaccins à ARNm qui seront évalués en dehors d'une période de pandémie. Ceci est d'autant plus vrai que le nombre final de doses de vaccin ARNm COVID-19 qu'un individu recevra n'est pas encore connu.

4.2.3. Problème posé par la présence de gènes de résistance aux antibiotiques

Le plasmide d'ADN utilisé comme modèle pour la production d'ARNm contient un gène de résistance à la kanamycine [33] (p. 26). Étant donné les quantités importantes et variables d'ADN contaminant dans la substance médicamenteuse, on peut craindre que le gène de résistance soit intégré dans les bactéries du tube digestif humain ou dans les cellules somatiques [37]. Si les ARNm anti-COVID-19 avaient été soumis à la régulation du GTP, ces études auraient été réalisées.

Par conséquent, les contrôles requis pour tous les médicaments et vaccins n'ont pas donné de résultats entièrement satisfaisants en ce qui concerne la pureté et la qualité du produit.

4.3. Contrôles requis pour les GTP qui n'ont pas été effectués : Questions de sécurité liées à la pharmacocinétique de l'ARNm

4.3.1. Pharmacocinétique des ARNm anti-COVID-19

Les contrôles pharmacocinétiques requis pour une nouvelle formulation de vaccin n'ont pas été entièrement réalisés. Il est regrettable que des études pharmacocinétiques complètes n'aient pas été menées car l'EMA souligne que plusieurs rapports dans la littérature indiquent que les ARN formulés en LNP peuvent se distribuer de manière non spécifique dans plusieurs organes tels que la rate, le cœur, les reins, les poumons et le cerveau [11] (p. 54). En outre, des études indépendantes après commercialisation ont montré la distribution et la persistance de l'ARNm pendant plusieurs semaines dans de nombreux organes [50-52]. Le produit de l'ARNm, la spike, circule également dans le sang pendant plusieurs semaines [53-56]. La protéine spike a été retrouvée dans le cerveau et le cœur d'une personne décédée 3 semaines après la vaccination [57]. La spike a été retrouvée dans des lésions cutanées jusqu'à 100 jours après la vaccination [58]. Les études précliniques fournies par les fabricants semblent donc incomplètes d'un point de vue pharmacocinétique, car elles n'ont pas détecté cette large biodistribution et cette persistance.

Pour Pfizer, seuls les composants isolés des nanoparticules ont été étudiés en termes de biodistribution. L'EMA note, à partir d'études sur des composants similaires réalisées pour un GTP (données Patisiran), que l'on peut s'attendre à une demi-vie de 20 à 30 jours chez l'homme, et de 4 à 5 mois pour l'élimination complète des lipides des nanoparticules. La biodistribution aurait dû être étudiée sur la nanoparticule complète chargée en ARNm, d'autant plus que les études précliniques ont montré une biodistribution dans tous les organes [32].

Selon le document Spikevax-EPAR [11], les études de biodistribution, de génotoxicité et de toxicité répétée ont été réalisées avec des ARNm codant pour des protéines autres que la spike du SARS-CoV-2. Ceci n'est pas compatible avec la réglementation GTP, car l'EMA exige que les études de distribution soient menées sur le transgène, tel qu'il est inclus dans le GTP final [37].

Ces données de biodistribution auraient dû renforcer la nécessité de certains contrôles essentiels des GTP. En effet, l'EMA [38] exige qu'en cas de signes d'expression à long terme, l'intégration génomique involontaire et l'oncogenèse soient étudiées. La durée et l'expression doivent être déterminées par RT-PCR et par des tests immunologiques et/ou des tests de détection de protéines fonctionnelles. La surexpression du transgène doit être surveillée [38]. Cela aurait dû être contrôlé, étant donné que de grandes quantités de la protéine spike peuvent être produites, parfois en excès par rapport à celles circulant chez les personnes atteintes de COVID-19 sévère. Une comparaison des concentrations de spike obtenues pendant la maladie et après la vaccination montre que, lors d'une infection sévère par COVID-19, la concentration médiane observée est de 50 pg/mL, avec des maximums de 1 ng/mL. Au cours de l'infection sévère par le COVID-19, des niveaux allant jusqu'à 135 pg/mL de pic S1 peuvent être détectés, le plus souvent entre 6

et 50 pg/mL. Après une vaccination avec un vaccin ARNm, des concentrations allant jusqu'à 150 pg/ml sont couramment observées, mais elles peuvent atteindre 10 ng/ml chez les personnes souffrant de thrombocytopénie induite par le vaccin [55,59].

4.3.2. Cette large biodistribution aurait dû rendre essentielle la réalisation des contrôles requis pour les GTP

Intégration dans la lignée germinale

La possibilité de transmission verticale à la lignée germinale doit être étudiée (signaux dans les gonades, signaux dans les gamètes, études de fractionnement du sperme et analyse d'intégration), d'autant plus que l'EMA met l'accent sur une biodistribution plus large, avec une radioactivité faible et mesurable dans les ovaires et les testicules [11]. Des études d'intégration dans le génome sont requises pour les GTP [24]. Il a été précisé en 2009 que, pour les médicaments de thérapie génique dont on ne s'attend pas à ce qu'ils soient capables d'intégration, des études d'intégration doivent être réalisées si la biodistribution du produit indique un risque de transmission germinale [13]. Un document de 2005, consacré spécifiquement à l'étude de la transmission germinale des vecteurs de transfert de gènes et de l'ADN nu, précise que seul l'ADN, et non l'ARN, est présumé présenter un risque de modification germinale [60]. Cette affirmation peut être remise en cause sur la base de deux publications montrant, d'une part, que l'ARN du SARS-CoV-2 peut s'intégrer dans le génome [61] et, d'autre part, que l'ARNm du vaccin peut s'intégrer dans le génome de cellules humaines en culture [62]. Bien que contestés [63], ces résultats tendraient à exiger des études d'intégration du génome pour les ARNm, d'autant plus que l'ARNm de la spike est également transloqué dans le noyau [64].

Génotoxicité

Les études précliniques de génotoxicité chez le rat pour Moderna ont donné des résultats équivoques [65] (p. 21). La conclusion était la suivante " :Globalement, le risque génotoxique pour l'homme est considéré comme faible en raison de l'exposition systémique minimale après administration IM, de la durée limitée de l'exposition et des résultats in vitro négatifs". Il aurait été judicieux de poursuivre ces études, étant donné que l'exposition n'est pas limitée aux muscles et que la durée d'exposition ne l'est pas non plus. Comme le précise la réglementation de l'EMA pour les GTP " ,en cas de résultat positif, des tests supplémentaires seront nécessaires pour garantir la sécurité du produit" [38].

Toxicité pour la reproduction et le développement

Selon un document concernant les essais non cliniques du vaccin Moderna obtenu par FOIA, des variations squelettiques (un ou plusieurs nodules de côtes et une ou plusieurs côtes ondulées sans effet sur la viabilité ou la croissance et le développement de la génération F1) sont apparues chez les fœtus des rats vaccinés mais n'ont pas été considérées comme néfastes. Cependant, il faut souligner qu'elles sont apparues en

même temps que la toxicité maternelle, ce qui correspond à la période la plus sensible pour le développement des côtes chez les rats [65].

Selon les documents obtenus par le FOIA auprès des agences réglementaires australienne [66] et japonaise [67], des malformations du squelette ont également été constatées dans l'essai préclinique de Pfizer. L'incidence des côtes lombaires surnuméraires était plus élevée dans le groupe traité que dans le groupe témoin, mais n'a pas été considérée comme liée au traitement. Cette concordance des anomalies fœtales avec les deux types de vaccins ARNm aurait dû conduire à des études plus détaillées.

Pharmacocinétique de la nanomédecine selon la FDA

Pour un nouvel excipient, les informations chimiques, pharmaceutiques et biologiques doivent être identiques à celles fournies pour la substance active [17] (p. 135). Par ailleurs, selon Hemmrich et McNeil [68], le statut des composants des LNP est confus selon la FDA ; ils sont considérés soit comme des "matières premières" (et donc pas comme des excipients), soit comme des "ingrédients inactifs" (et donc des excipients) selon les documents alors que, selon la FDA elle-même, ils devraient être considérés comme des ingrédients actifs. Selon les mêmes auteurs, les développeurs doivent démontrer la sécurité du nouvel ingrédient, et "les excipients destinés à une utilisation à long terme peuvent nécessiter des études toxicologiques à doses répétées sur 6 mois et des études de cancérogénicité sur 2 ans". En effet, les fabricants ne prévoient que deux doses de vaccin [46], mais certaines populations reçoivent actuellement jusqu'à six doses espacées de quelques mois. C'est la stabilité, la toxicité et la biodistribution de la nanoparticule intacte contenant l'ARNm, la substance active, qui doivent être évaluées, et non les composants lipidiques isolés, contrairement à ce qui a été réalisé (Moderna et Pfizer ont partiellement évalué la biodistribution des lipides dans les nanoparticules, ou des nanoparticules contenant des ARNm autres que ceux utilisés dans les vaccins anti-COVID-19) [11,32-34].

La classification par la FDA de ces ARNm en tant que GTP aurait permis de lever ces ambiguïtés puisque la FDA recommande d'évaluer les risques de la procédure d'administration des GTP (biodistribution dans le sang, le liquide céphalo-rachidien, la lignée germinale, le cœur et le cerveau à évaluer dans les essais précliniques, persistance du vecteur). La FDA exige également l'évaluation de la transmission horizontale potentielle des vecteurs compétents pour la réplication du patient aux membres de sa famille et aux prestataires de soins de santé (c'est-à-dire l'excrétion). Cette exigence aurait dû s'appliquer même si le vecteur n'est pas un virus capable de réplication.

4.4. Études cliniques

Comme indiqué ci-dessus, il a été démontré que la protéine spike circule bien dans le sang, des études d'excrétion auraient donc dû être réalisées. Le CHMP a noté qu'aucune donnée n'est disponible sur le transfert placentaire du vaccin ou son excrétion dans le lait [11] (p. 56). Des études indépendantes des fabricants ont montré le passage de l'ARNm du vaccin dans le lait maternel au cours de la première semaine suivant l'injection

[69-72] et des effets indésirables sur les bébés allaités pourraient être dus à ce passage selon un rapport de la FDA [73]. Il a été démontré que les nanoparticules, similaires à celles des vaccins ARNm COVID-19, sont capables de traverser la barrière placentaire chez la souris [74]. Des études précliniques et cliniques approfondies auraient dû explorer ce passage dans le lait et à travers le placenta.

Des études de cancérogénicité, de tumorigénicité et d'immunosuppression auraient dû être réalisées, car deux études ont suggéré que les vaccins ARNm pouvaient induire une immunotolérance [75,76]. En outre, la protéine spike peut interagir avec le suppresseur de tumeur p 53 [77,78]. Il serait donc judicieux d'explorer l'effet tumorigène in vivo et de surveiller les éventuels cancers développés par les personnes vaccinées sur le long terme, d'autant plus qu'il a été suggéré que les cancers peuvent être réactivés par les vaccins ARNm [79- 81] ou se développer après une vaccination ARNm [82-86].

4.5. Vaccinovigilance

Les règlements concernant les GTP exigent un suivi à très long terme des effets indésirables. Cela sera difficile à réaliser pour les vaccins ARNm car l'EMA a demandé un suivi de 24 mois des effets indésirables après la vaccination, soulignant qu'un nombre important de participants dans le groupe placebo ont été vaccinés, ce qui rend ce suivi plus difficile [34] (pp. 14, 114 et 138). Moderna a annoncé que "depuis le 13 avril 2021, tous les participants du groupe placebo se sont vus proposer le vaccin Moderna COVID-19 et 98% d'entre eux ont reçu le vaccin" [87].

La dernière date de suivi de pharmacovigilance demandée par l'EMA est le 31 mars 2024 [11], bien en deçà du suivi à long terme des effets indésirables des GTP par la FDA, qui est de 5 à 15 ans, et de 30 ans pour l'EMA. En plus du plan de pharmacovigilance étendu demandé par l'EMA [11], nous pourrions demander un suivi renforcé. Les groupes placebo des essais cliniques étant vaccinés, le suivi à long terme de ces effets indésirables pourrait être réalisé par des études observationnelles rétrospectives comparant l'incidence des pathologies en fonction du statut vaccinal des participants. Deux publications sur les vecteurs adénoviraux [88,89] suggèrent que les effets à long terme des vecteurs de thérapie génique, bien qu'ils ne soient pas spécifiquement des vecteurs d'ARNm, illustrent bien le manque d'étude et les risques potentiels à long terme.

La FDA et l'EMA recommandent le suivi à long terme des éventuels effets indésirables des GTP, en particulier pour certaines maladies (cancers, affections hématologiques, neurologiques, rhumatologiques et infections). Nous avons vu plus haut qu'il existe des cas rapportés de nouveaux cancers ou de réactivation de cancers suite à la vaccination par les ARNm anti-COVID-19. Des cas de maladies à surveiller spécifiquement après l'administration de GTP ont également été rapportés. Voici quelques exemples, car il est impossible d'être exhaustif. En ce qui concerne les troubles hématologiques, des cas de suppression de la moelle osseuse [90] et d'anémie aplastique [91] ont été rapportés. Pour les affections neurologiques, des encéphalites [57], des rhomboencéphalites [92], des démyélinisations [93] et des maladies neurologiques auto-immunes [94] ont été notées.

Des affections rhumatologiques [95], des maladies rhumatismales auto-immunes de novo [96], des myopathies auto-immunes [97] et des maladies inflammatoires nouvelles ou exacerbées [94] ont également été signalées.

Une recrudescence des abcès cérébraux en 2021, après le début de la campagne de vaccination massive, est rapportée [98] ainsi que des pneumonies non COVID-19 suite à des vaccins ARNm [99].

L'EMA souligne qu'une étude interventionnelle est en cours pour évaluer la sécurité et la tolérance du vaccin de Pfizer chez les femmes enceintes [11] ; bien que la date de fin de l'étude soit le 15 juillet 2022, aucun résultat n'a été publié [100], ce qui est regrettable.

5. Conclusion

Bien que le principe d'action des vaccins ARNm COVID-19 corresponde à la définition des produits de thérapie génique (GTP), ils ont été exclus de la réglementation des GTP par les agences réglementaires (US-FDA et EMA) et soumis à la réglementation des vaccins contre les maladies infectieuses. Aucune justification scientifique ou éthique n'est donnée à cette exclusion, et il subsiste des incohérences dans les réglementations. Par exemple, selon les réglementations européenne et française, un vaccin doit contenir un antigène, ce qui n'est pas le cas des vaccins à ARNm. Ces produits pourraient être considérés comme "pro-vaccins". En effet, les vaccins ARNm ne contiennent pas d'antigène, mais le font produire par le vacciné. Ils peuvent donc être qualifiés de pro-médicaments ou de "pro-vaccins". Une réglementation particulière devrait être élaborée pour ce type de produit, en insistant sur le contrôle de la puissance, c'est-à-dire la qualité, la quantité, la durée et les sites d'expression de l'antigène d'intérêt, ainsi que la toxicité de cet antigène. Comme proposé début 2020, la protéine spike du SRAS-CoV-2 interagit avec le système rénine-angiotensine [101-103] et a une toxicité reconnue, connue dès avant COVID-19 [104] et confirmée depuis [105-108].

Selon la réglementation européenne, les vaccins sont des médicaments humains et doivent donc subir les mêmes contrôles, mais tous ces contrôles ne sont généralement pas appliqués aux vaccins contre les maladies infectieuses. En ce qui concerne les contrôles appliqués aux ARNm, il convient de noter que le degré de pureté du produit est inférieur à celui exigé pour tout médicament : ceci est discutable pour une nouvelle formulation et un nouveau principe d'action. Il est également possible que l'hétérogénéité des lots n'ait pas été détectée par la procédure de libération des lots. Les impuretés liées à cette nouvelle formulation pourraient poser des problèmes de sécurité ; la présence et la quantité d'ADN contaminant (matrice utilisée pour la fabrication de l'ARN) et d'ARN ds devraient être réévaluées. La présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans l'ADN matrice contaminant pose également des problèmes de sécurité.

Les études pharmacocinétiques ne sont généralement pas nécessaires pour les vaccins, sauf dans le cas de nouvelles formulations, ce qui est le cas ici. Cependant, des études approfondies dans ce domaine auraient été nécessaires, car elles n'ont pas permis de détecter la large distribution et la persistance de l'ARNm, et de son produit, la protéine spike, dans l'organisme des vaccinés, le passage de l'ARNm dans le lait maternel, ni

l'éventuel passage à travers le placenta des mères vaccinées. La réglementation des GTP impose ces études approfondies sur la formulation complète (la nanoparticule lipidique chargée de l'ARNm correspondant au médicament).

En raison de cette biodistribution étendue et persistante, les tests essentiels requis pour les GTP auraient dû être effectués en ce qui concerne : le risque de génotoxicité, l'intégration du génome et la transmission germinale, la mutagenèse insertionnelle, la tumorigénicité, la toxicité embryonnaire/fœtale et périnatale, l'expression à long terme, la toxicité répétée et l'excrétion dans l'environnement (excrétion dans le liquide séminal, par exemple).

La surveillance de la sécurité à long terme des GTP doit s'étendre sur plusieurs années alors que, pour les vaccins, elle n'est généralement effectuée que sur quelques semaines. Ceci ne devrait pas être acceptable, compte tenu de la persistance du produit injecté et de la protéine exprimée. Les résultats connus des thérapies anticancéreuses et des vaccins ARNm pourraient nous amener à anticiper des problèmes de sécurité et d'efficacité. Dans le cas des ARNm anticancéreux, la grande majorité des essais cliniques ouverts ont été réalisés sur un très petit nombre de patients, avec des résultats non publiés ou négatifs [109,110]. Des études randomisées ont également donné des résultats négatifs, rapportant des effets indésirables plus fréquents dans le groupe traité [111,112]. En ce qui concerne les maladies infectieuses, deux essais de vaccins ARNm encapsulés dans des LNP ont montré des effets indésirables notables. Un essai de vaccin ARNm contre la rage a montré de nombreux effets indésirables supérieurs à ceux du vaccin classique, déjà très réactogène, notamment une lymphopénie (cet effet a également été retrouvé pour les vaccins ARNm anti-COVID-19) [113]. Un essai de vaccin antigrippal [114] a montré des effets indésirables sévères chez l'homme (31 sujets ont été observés pendant seulement 43 jours et au moins 4 effets indésirables graves ont été trouvés). Dans un essai non randomisé contre le VIH [115], la réponse a été inexplicablement incomplète chez certains patients. D'après un autre essai sur le VIH mené auprès de 15 participants contre un placebo, les réponses immunitaires étaient insatisfaisantes et de durée limitée [116]. Le fondateur de BioNTech lui-même, Ugur Sahin, a mis en garde contre l'utilisation de l'optimisation des codons, qui peut altérer la vitesse de traduction et conduire à un mauvais repliement. Il a également souligné la toxicité potentielle des nucléotides non naturels. Il a également mentionné la large biodistribution de l'ARNm injecté par voie intramusculaire. Il nous a rappelé que nous devons craindre l'apparition d'auto-anticorps anti-ARNm chez les patients souffrant de maladies auto-immunes [27].

Le rôle des agences de réglementation est de garantir la sécurité et l'efficacité des médicaments. L'urgence pandémique COVID-19 a accéléré le calendrier de production et d'utilisation clinique des vaccins COVID-19 ; il est donc possible que certains aspects de la sécurité n'aient pas été pleinement pris en compte. Il est donc important de tenir compte de ces aspects à l'avenir, afin de ne pas ébranler la confiance du public dans les vaccins en général.

L'OMS a déclaré la fin de la phase d'urgence de la pandémie de COVID-19 au début du mois de mai 2023, mais continuera à autoriser l'utilisation de la procédure d'utilisation

d'urgence (EUL). L'autorisation d'urgence des vaccins devrait être transformée en préqualification par une transition en douceur [117]. Cependant, un large débat public devrait être ouvert sur cette transition vers l'utilisation en routine des vaccins à ARNm, sans qu'ils soient soumis aux contrôles requis pour les GTP.

Dans le document de l'EMA destiné à encadrer l'évaluation clinique des nouveaux vaccins à partir de 2023, il n'est pas fait mention des vaccins ARNm, et il est toujours précisé que les vaccins contiennent des antigènes ; ce document ne s'appliquerait donc pas aux vaccins ARNm qui ne contiennent pas d'antigènes. Il est à nouveau précisé que des études pharmacocinétiques non cliniques pourraient être applicables lorsque de nouveaux systèmes d'administration sont utilisés ou lorsque le vaccin contient de nouveaux adjuvants ou excipients. Il est dommage que ces points n'aient pas été précisés spécifiquement pour les vaccins ARNm [118]. Un article datant du début de l'année 2021 [119] soulignait la nécessité de mener des études supplémentaires pour garantir la qualité, l'efficacité et la sécurité des vaccins à ARNm ; il a été écrit avant que ces produits ne soient commercialisés. Il semble important de clarifier quels contrôles supplémentaires devraient être requis à la lumière des résultats détaillés des essais précliniques et des données de sécurité publiées au cours de la phase de post-commercialisation.

À l'avenir, il conviendrait d'examiner si tous les produits à base d'ARNm devraient être soumis aux mêmes réglementations et contrôles, qu'ils soient ou non considérés comme des vaccins. Il n'est pas justifié de soumettre les ARNm thérapeutiques à des contrôles stricts lorsqu'ils sont destinés à des patients représentant une petite proportion de la population humaine, et d'exclure de ces contrôles les vaccins à ARNm destinés à la majorité de la population humaine en bonne santé.

Financement : Cette recherche n'a bénéficié d'aucun financement externe.

Déclaration du comité d'examen institutionnel : Sans objet.

Déclaration de consentement éclairé : Sans objet.

Déclaration de disponibilité des données : Sans objet.

Remerciements : Les frais de publication ont été payés par aimsib.org (consulté le 1er juin 2023).

Conflits d'intérêts : L'auteur ne déclare aucun conflit d'intérêts.

Références

1. Polykretis, P.; McCullough, P.A. Rational harm-benefit assessments by age group are required for continued COVID-19 vaccination. *Scand. J. Immunol.* **2022**, *98*, e13242. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

2. Verbeke, R.; Lentacker, I.; De Smedt, S.C.; Dewitte, H. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *J. Control. Release* **2021**, *333*, 511–520. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
3. Shukla, V.; Seoane-Vazquez, E.; Fawaz, S.; Brown, L.; Rodriguez-Monguio, R. The Landscape of Cellular and Gene Therapy Products: Authorization, Discontinuations, and Cost. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **2020**, *30*, 102–113. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Guerriaud, M.; Kohli, E. RNA-based drugs and regulation: Toward a necessary evolution of the definitions issued from the European union legislation. *Front. Med.* **2022**, *9*, 1012497. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Vervaeke, P.; Borgos, S.E.; Sanders, N.N.; Combes, F. Regulatory guidelines and preclinical tools to study the biodistribution of RNA therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, *184*, 114236. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Marinus, R.; Mofid, S.; Mpandzou, M.; Kühler, T.C. Rolling Reviews During COVID-19: The European Union Experience in a Global Context. *Clin. Ther.* **2022**, *44*, 352–363. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sanofi. Sanofi and Translate Bio Initiate Phase 1 Clinical Trial of mRNA Influenza Vaccine. 22 June 2021. Available online: <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2021/2021-06-22-05-00-00-2250633> (accessed on 14 June 2023).
8. Moderna. mRNA Pipeline. Available online: <https://www.modernatx.com/research/product-pipeline> (accessed on 15 February 2023).
9. NIH. A Study to Evaluate Safety and Immunogenicity of a Single Dose of H1ssF-3928 mRNA-LNP in Healthy Adults. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05755620> (accessed on 29 May 2023).
10. Moderna and Merck Announce Mrna-4157/V940, an Investigational Personalized mRNA Cancer Vaccine, in Combination with Keytruda(R) (Pembrolizumab), Met Primary Efficacy Endpoint in Phase 2b Keynote-942 Trial. 13 December 2022. Available online: <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2022/Moderna-and-Merck-Announce-mRNA-4157V940-an-Investigational-Personalized-mRNA-Cancer-Vaccine-in-Combination-with-KEYTRUDAR-pembrolizumab-Met-Primary-Efficacy-Endpoint-in-Phase-2b-KEYNOTE-942-Trial/default.aspx> (accessed on 26 February 2023).
11. EMA/707383/2020 Corr.1 *1 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment Report Comirnaty Common Name: COVID-19 mRNA Vaccine (Nucleoside-Modified) Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000. 19 February 2021. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed on 13 June 2023).
12. FDA Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy, CBER March 1998, Current Content as of 21 April 2021. Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-human-somatic-cell-therapy-and-gene-therapy> (accessed on 13 June 2023).
13. COMMISSION DIRECTIVE 2009/120/EC of 14 September 2009 Amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use as Regards Advanced Therapy Medicinal Products. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2009/120/oj> (accessed on 13 June 2023).
14. WHO Guidelines on Non-Clinical Evaluation of Vaccines, Annex 1, TRS No 927, 1 January 2005, Meeting Report. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccines-annex-1-trs-no-927> (accessed on 14 June 2023).
15. ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé), «Les Vaccins». Available online: <https://ansm.sante.fr/qui-sommes-nous/notre-perimetre/les-vaccins/p/les-vaccins-2> (accessed on 26 February 2023).
16. CDC Immunization: The Basics. Available online: <https://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/imz->

- [basics.htm#:~:text=Vaccine%3A%20A%20preparation%20that%20is,body%27s%20immune%20response%20against%20diseases](#) (accessed on 9 May 2023).
17. EMA. 2001 Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use. Updated on 16.11.2012. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0083> (accessed on 14 June 2023).
 18. Wu, K.-M. A New Classification of Prodrugs: Regulatory Perspectives. *Pharmaceuticals* **2009**, *2*, 77–81. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 19. FDA. 2007 Guidance for Industry Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. November 2007. Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-plasmid-dna-vaccines-infectious-disease-indications> (accessed on 14 June 2023).
 20. FDA. Guidance for Industry Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. November 2013. Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/preclinical-assessment-investigational-cellular-and-gene-therapy-products> (accessed on 14 June 2023).
 21. FDA. 61 FR 68269—Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications. 20 December 1996. Available online: <https://www.govinfo.gov/app/details/FR-1996-12-27/96-32930> (accessed on 14 June 2023).
 22. EMA. Reflection Paper on Classification of Advanced Therapy Medicinal Products EMA/CAT/600280/2010 Rev.1; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2015; Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-classification-advanced-therapy-medicinal-products_en-0.pdf (accessed on 14 June 2023).
 23. EMA 2006, Committee for Medicinal Products for Human Use CHMP Guideline on Clinical Evaluation of New Vaccines London. EMEA/CHMP/VWP/164653/2005. 18 October 2006. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-new-vaccines_en.pdf (accessed on 14 June 2023).
 24. EMA. Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on Advanced Therapy Medicinal Products and Amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. 2007. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:324:0121:0137:en:PDF> (accessed on 14 June 2023).
 25. Liu, M.A.; Zhou, T.; Sheets, R.L.; Meyer, H.; Knezevic, I. WHO informal consultation on regulatory considerations for evaluation of the quality, safety and efficacy of RNA-based prophylactic vaccines for infectious diseases, 20–22 April 2021. *Emerg. Microbes Infect.* **2022**, *11*, 384–391. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 26. Moderna. Quarterly Report Pursuant to Section 13 or 15(d) of the Securities Exchange Act of 1934 for the Quarterly Period Ended 30 June 2020. 6 August 2020. Available online: <https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1682852/000168285220000017/mrna-20200630.htm> (accessed on 22 July 2021).
 27. Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics—Developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 759–780. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 28. EMA/CHMP/SWP/242917/2016 Questions and Answers on the Withdrawal of the CPMP Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines (CPMP/SWP/465). 21 July 2016. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/questions-answers-withdrawal-cpmp-note-guidance-preclinical-pharmacological-toxicological-testing/swp/465_en.pdf (accessed on 14 June 2023).
 29. EMA. Scientific Recommendation on Classification of Advanced Therapy Medicinal Products. Live Recombinant Lentiviral Vectors Encoding HIV Epitopes to Be Used for Therapeutic HIV Vaccination of HIV-1 Infected Patients; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2011; Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/>

- [human-regulatory/marketing-authorisation/advanced-therapies/advanced-therapy-classification/scientific-recommendations-classification-advanced-therapy-medicinal-products](#) (accessed on 14 June 2023).
30. EMA Committees. The Scientific Advisory Group on Vaccines (SAG-V). Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/committees/working-parties-other-groups/chmp/scientific-advisory-group-vaccines> (accessed on 6 June 2023).
 31. EMA Committee. Vaccines Working Party. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/committees/working-parties-other-groups/chmp/vaccines-working-party> (accessed on 6 June 2023).
 32. EMA-EPAR-Moderna 11 March 2021 EMA/15689/2021 Corr.1*1 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment Report COVID-19 Vaccine Moderna Procedure No. EMEA/H/C/005791/0000. 11 March 2021. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed on 14 June 2023).
 33. EMEA/H/C/005735/RR. Rapporteur Rolling Review Critical Assessment Report: Quality Aspects. European Medicines Agency, 2020 Obtained by FOIA. Available online: <https://covidvaccinereactions.com/ema-pfizer-leak/> (accessed on 13 June 2023).
 34. EMA EMEA/H/C/005735/RR. Rapporteur's Rolling Review Critical Assessment Report: Overview and List of Questions. (CHMP); European Medicines Agency: Obtained by FOIA. 2020. Available online: <https://covidvaccinereactions.com/ema-pfizer-leak/downloads> (accessed on 14 June 2023).
 35. EMA/CHMP/448917/2021 Type II Group of Variations Assessment Report Procedure EMEA/H/C/005735/II/0056/G Comirnaty Obtained by FOIA. Available online: <https://files.catbox.moe/sg745z.pdf> (accessed on 13 June 2023).
 36. TGA Batch Release Assessment of COVID-19 Vaccines Australian Government Dept of Health and Aged Care Therapeutic Goods Administration. Available online: <https://www.tga.gov.au/batch-release-assessment-covid-19-vaccines> (accessed on 21 May 2023).
 37. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006 Guideline on the Non-Clinical Studies Required before First Clinical Use of GTMP London. 30 May 2008. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-studies-required-first-clinical-use-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf (accessed on 14 June 2023).
 38. EMA GTP 2018 CAT/80183/2014 Adoption by CHMP 22 March 2018 Guideline on the Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Gene Therapy Medicinal Products. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf (accessed on 14 June 2023).
 39. FDA Cellular & Gene Therapy Guidances. Available online: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/biologics-guidances/cellular-gene-therapy-guidances> (accessed on 14 June 2023).
 40. EMA/CPMP/ICH/286/1995 ICH Guideline M3(R2) on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorisation for Pharmaceuticals Step. 5 December 2009. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals-scientific#current-effective-version-section> (accessed on 14 June 2023).
 41. EMA Committee for Advanced Therapies. Minutes of the Meeting of 15–17 July 2020. EMA/CAT/510852/2020; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/events/committee-advanced-therapies-cat-15-17-july-2020> (accessed on 14 June 2023).
 42. FDA. Long Term Follow-Up after Administration of Human Gene Therapy Products Center for Biologics Evaluation and Research January 2020. Available online: <https://www.fda.gov/media/113768/download> (accessed on 14 June 2023).

43. The Brighton Collaboration. Available online: <https://brightoncollaboration.us/about/> (accessed on 7 June 2023).
44. Brighton Collaboration Publications. Available online: https://docs.google.com/spreadsheets/d/1QgF35nYcsaFN3DZTOtV_IP0TYqQzsDMUQBAAd5M9brrM/edit#gid=0 (accessed on 7 June 2023).
45. Wong, H.-L.; Tworokski, E.; Zhou, C.K.; Hu, M.; Thompson, D.; Lufkin, B.; Do, R.; Feinberg, L.; Chillarige, Y.; Dimova, R.; et al. Surveillance of COVID-19 vaccine safety among elderly persons aged 65 years and older. *Vaccine* **2023**, *41*, 532–539. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. EMA/896245/2022 Assessment Report Spikevax Procedure No. EMEA/H/C/005791/II/0075/G. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-h-c-005791-ii-0075-g-epar-assessment-report-variation_en.pdf (accessed on 14 June 2023).
47. EU Official Control Authority Batch Release Human Vaccines Guideline for Pandemic COVID-19 Vaccine (mRNA). Available online: <https://www.edqm.eu/fr/ocabr-activities-related-to-covid-19-vaccines> (accessed on 14 June 2023).
48. Schmeling, M.; Manniche, V.; Hansen, P.R. Batch-dependent safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *Eur. J. Clin. Investig.* **2023**. Epub ahead of print. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. WHO. Informal Consultation on the Application of Molecular Methods to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Vaccines. 2005. Available online: <https://www.who.int/docs/default-source/biologicals/vaccine-quality/69-molecular-methods-final-mtg-report-april2005.pdf> (accessed on 14 June 2023).
50. Fertig, T.E.; Chitoiu, L.; Marta, D.S.; Ionescu, V.-S.; Cismasiu, V.B.; Radu, E.; Angheluta, G.; Dobre, M.; Serbanescu, A.; Hinescu, M.E.; et al. Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1538. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Röltgen, K.; Nielsen, S.C.; Silva, O.; Younes, S.F.; Zaslavsky, M.; Costales, C.; Yang, F.; Wirz, O.F.; Solis, D.; Hoh, R.A.; et al. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell* **2022**, *185*, 1025–1040.e14. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Magen, E.; Mukherjee, S.; Bhattacharya, M.; Detroja, R.; Merzon, E.; Blum, I.; Livoff, A.; Shlapobersky, M.; Baum, G.; Talisman, R.; et al. Clinical and Molecular Characterization of a Rare Case of BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine-Associated Myositis. *Vaccines* **2022**, *10*, 1135. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yonker, L.M.; Swank, Z.; Bartsch, Y.C.; Burns, M.D.; Kane, A.; Boribong, B.P.; Davis, J.P.; Loisel, M.; Novak, T.; Senussi, Y.; et al. Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. *Circulation* **2023**, *147*, 867–876. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ogata, A.F.; Cheng, C.-A.; Desjardins, M.; Senussi, Y.; Sherman, A.C.; Powell, M.; Novack, L.; Von, S.; Li, X.; Baden, L.R.; et al. Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients. *Clin. Infect. Dis.* **2022**, *74*, 715–718. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cognetti, J.S.; Miller, B.L. Monitoring Serum Spike Protein with Disposable Photonic Biosensors Following SARS-CoV-2 Vaccination. *Sensors* **2021**, *21*, 5857. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
56. Patterson, B.K.; Francisco, E.B.; Yogendra, R. SARS-CoV-2 S1 protein persistence in SARS-CoV-2 negative post-vaccination individuals with long COVID/PASC-like symptoms. *Res. Sq.* **2022**. preprint. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

57. Mörz, M. A Case Report: Multifocal Necrotizing Encephalitis and Myocarditis after BNT162b2 mRNA Vaccination against COVID-19. *Vaccines* **2022**, *10*, 1651. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
58. Sano, H.; Kase, M.; Aoyama, Y.; Sano, S. A case of persistent, confluent maculopapular erythema following a COVID-19 mRNA vaccination is possibly associated with the intralesional spike protein expressed by vascular endothelial cells and eccrine glands in the deep dermis. *J. Dermatol.* **2023**, in press. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
59. Ogata, A.F.; Maley, A.; Wu, C.; Gilboa, T.; Norman, M.; Lazarovits, R.; Mao, C.-P.; Newton, G.; Chang, M.; Nguyen, K.; et al. Ultra-Sensitive Serial Profiling of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies in Plasma to Understand Disease Progression in COVID-19 Patients with Severe Disease. *Clin. Chem.* **2020**, *66*, 1562–1572. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
60. EMEA/273974/2005 Note for Guidance CPMP/BWP/3088/99, Annex on Non-Clinical Testing for Inadvertent Germline Transmission of Gene Transfer Vectors. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-testing-inadvertent-germline-transmission-gene-transfer-vectors_en.pdf (accessed on 14 June 2023).
61. Zhang, L.; Richards, A.; Barrasa, M.I.; Hughes, S.H.; Young, R.A.; Jaenisch, R. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2105968118. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
62. Aldén, M.; Olofsson Falla, F.; Yang, D.; Barghouth, M.; Luan, C.; Rasmussen, M.; De Marinis, Y. Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 1115–1126. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
63. Grandi, N.; Tramontano, E.; Berkhout, B. Integration of SARS-CoV-2 RNA in infected human cells by retrotransposons: An unlikely hypothesis and old viral relationships. *Retrovirology* **2021**, *18*, 34. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
64. Sattar, S.; Kabat, J.; Jerome, K.; Feldmann, F.; Bailey, K.; Mehedi, M. Nuclear translocation of spike mRNA and protein is a novel feature of SARS-CoV-2. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1073789. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
65. ModernaTX, Inc. 2.4 Nonclinical Overview FDA-CBER-2021-4379-0001131 Obtained by FOIA by Judicial Watch, Inc. Available online: <https://www.judicialwatch.org/wp-content/uploads/2022/12/JW-v-HHS-Biodistribution-Prod-4-02418-pgs-671-701.pdf> (accessed on 14 June 2023).
66. TGA Australian Government Dept of Health and Aged Care Therapeutic Goods Administration Nonclinical Evaluation Report BNT162b2 [mRNA] COVID-19 Vaccine (COMIRNATYTM) Submission No: PM-2020-05461-1-2 Sponsor: Pfizer Australia Pty Ltd. January 2021. Available online: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/foi-2389-06.pdf> (accessed on 14 June 2023).
67. Japan, Report on the Deliberation Results February 12, 2021 Pharmaceutical Evaluation Division, Pharmaceutical Safety and Environmental Health Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare, Comirnaty Intramuscular Injection_Pfizer Japan Inc._Report on Special Approval for Emergency Japan Inc. 18 December 2020. Available online: <https://www.pmda.go.jp/files/000243206.pdf> (accessed on 14 June 2023).
68. Hemmrich, E.; McNeil, S. Active ingredient vs excipient debate for nanomedicines. *Nat. Nanotechnol.* **2023**. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
69. Yeo, K.T.; Chia, W.N.; Tan, C.W.; Ong, C.; Yeo, J.G.; Zhang, J.; Poh, S.L.; Lim, A.J.M.; Sim, K.H.Z.; Sutamam, N.; et al. Neutralizing Activity and SARS-CoV-2 Vaccine mRNA Persistence in Serum and Breastmilk After BNT162b2 Vaccination in Lactating Women. *Front. Immunol.* **2022**, *12*, 783975. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

70. Low, J.M.; Gu, Y.; Ng, M.S.F.; Amin, Z.; Lee, L.Y.; Ng, Y.P.M.; Shunmuganathan, B.D.; Niu, Y.; Gupta, R.; Tambyah, P.A.; et al. Codominant IgG and IgA expression with minimal vaccine mRNA in milk of BNT162b2 vaccinees. *NPJ Vaccines* **2021**, *6*, 105. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
71. Hanna, N.; Heffes-Doon, A.; Lin, X.; De Mejia, C.M.; Botros, B.; Gurzenda, E.; Nayak, A. Detection of Messenger RNA COVID-19 Vaccines in Human Breast Milk. *JAMA Pediatr.* **2022**, *176*, 1268–1270. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
72. Golan, Y.; Prah, M.; Cassidy, A.G.; Gay, C.; Wu, A.H.B.; Jigmeddagva, U.; Lin, C.Y.; Gonzalez, V.J.; Basilio, E.; Chidboy, M.A.; et al. COVID-19 mRNA Vaccination in Lactation: Assessment of Adverse Events and Vaccine-Related Antibodies in Mother-Infant Dyads. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 777103. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
73. COVID-19 Vaccine-Safety Review for PLLR Label Update BNT162b2 Cumulative Review from Pharmacovigilance Database Pregnancy and Lactation Cumulative Review 20 April 2021 FDA-CBER-2021-5683-0779752. Available online: https://phmp.org/wp-content/uploads/2023/04/125742_S2_M1_pllr-cumulative-review.pdf (accessed on 14 June 2023).
74. Swingle, K.L.; Safford, H.C.; Geisler, H.C.; Hamilton, A.G.; Thatte, A.S.; Billingsley, M.M.; Joseph, R.A.; Mrksich, K.; Padilla, M.S.; Ghalsasi, A.A.; et al. Ionizable Lipid Nanoparticles for In Vivo mRNA Delivery to the Placenta during Pregnancy. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 4691–4706. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
75. Irrgang, P.; Gerling, J.; Kocher, K.; Lapuente, D.; Steininger, P.; Habenicht, K.; Wytopil, M.; Beileke, S.; Schäfer, S.; Zhong, J.; et al. Class switch toward noninflammatory, spike-specific IgG4 antibodies after repeated SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Sci. Immunol.* **2023**, *8*, eade2798. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
76. Gao, F.X.; Wu, R.X.; Shen, M.Y.; Huang, J.J.; Li, T.T.; Hu, C.; Luo, F.Y.; Song, S.Y.; Mu, S.; Hao, Y.N.; et al. Extended SARS-CoV-2 RBD booster vaccination induces humoral and cellular immune tolerance in mice. *iScience* **2022**, *25*, 105479. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
77. Singh, N.; Bharara Singh, A. S2 subunit of SARS-nCoV-2 interacts with tumor suppressor protein p53 and BRCA: An in silico study. *Transl. Oncol.* **2020**, *13*, 100814. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
78. Kyriakopoulos, A.M.; Nigh, G.; McCullough, P.A.; Seneff, S. Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Activation, p53, and Autophagy Inhibition Characterize the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike Protein Induced Neurotoxicity. *Cureus* **2022**, *14*, e32361. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
79. Goldman, S.; Bron, D.; Tousseyn, T.; Vierasu, I.; Dewispelaere, L.; Heimann, P.; Cogan, E.; Goldman, M. Rapid Progression of Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma Following BNT162b2 mRNA Vaccine Booster Shot: A Case Report. *Front. Med.* **2021**, *8*, 798095. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
80. Bae, E.; Bae, S.; Vays, M.; Abdelwahed, M.; Sarkar, K.; Bae, S.; Vaysblat, M. Development of High-Grade Sarcoma After Second Dose of Moderna Vaccine. *Cureus* **2023**, *15*, e37612. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
81. Revenga-Porcel, L.; Peñate, Y.; Granados-Pacheco, F. Anaplastic large cell lymphoma at the SARS-CoV2 vaccine injection site. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2023**, *37*, e32–e34. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Zamfir, M.-A.; Moraru, L.; Dobra, C.; Scheau, A.-E.; Iacob, S.; Moldovan, C.; Scheau, C.; Caruntu, C.; Caruntu, A. Hematologic Malignancies Diagnosed in the Context of the mRNA COVID-19 Vaccination Campaign: A Report of Two Cases. *Medicina* **2022**, *58*, 874. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
83. Mizutani, M.; Mitsui, H.; Amano, T.; Ogawa, Y.; Deguchi, N.; Shimada, S.; Miwa, A.; Kawamura, T.; Ogido, Y. Two cases of axillary lymphadenopathy diagnosed as diffuse large B-cell lymphoma developed shortly after BNT162b2 COVID-19 vaccination. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2022**, *36*, e613–e615. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

84. Cavanna, L.; Grassi, S.O.; Ruffini, L.; Michieletti, E.; Carella, E.; Palli, D.; Zangrandi, A.; Inzerilli, N.; Bernuzzi, P.; Di Nunzio, C.; et al. Non-Hodgkin Lymphoma Developed Shortly after mRNA COVID-19 Vaccination: Report of a Case and Review of the Literature. *Medicina* **2023**, *59*, 157. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Panou, E.; Nikolaou, V.; Marinos, L.; Kallambou, S.; Sidiropoulou, P.; Gerochristou, M.; Stratigos, A. Recurrence of cutaneous T-cell lymphoma post viral vector COVID-19 vaccination. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2022**, *36*, e91–e93. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Sekizawa, A.; Hashimoto, K.; Kobayashi, S.; Kozono, S.; Kobayashi, T.; Kawamura, Y.; Kimata, M.; Fujita, N.; Ono, Y.; Obuchi, Y.; et al. Rapid progression of marginal zone B-cell lymphoma after COVID-19 vaccination (BNT162b2): A case report. *Front. Med.* **2022**, *9*, 963393. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
87. Doshi, P. Covid-19 vaccines: In the rush for regulatory approval, do we need more data? *BMJ* **2021**, *373*, n1244. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
88. Montes-Galindo, D.A.; Espiritu-Mojarro, A.C.; Melnikov, V.; Moy-López, N.A.; Soriano-Hernandez, A.D.; Galvan-Salazar, H.R.; Guzman-Muñiz, J.; Guzman-Esquivel, J.; Martinez-Fierro, M.L.; Rodriguez-Sanchez, I.P.; et al. Adenovirus 5 produces obesity and adverse metabolic, morphological, and functional changes in the long term in animals fed a balanced diet or a high-fat diet: A study on hamsters. *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 775–786. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Tsilingiris, D.; Vallianou, N.G.; Karampela, I.; Muscogiuri, G.; Dalamaga, M. Use of adenovirus type-5 vector vaccines in COVID-19: Potential implications for metabolic health? *Minerva Endocrinol.* **2022**, *47*, 264–269. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
90. Shastri, T.; Randhawa, N.; Aly, R.; Ghouse, M. Bone Marrow Suppression Secondary to the COVID-19 Booster Vaccine: A Case Report. *J. Blood Med.* **2022**, *13*, 69–74. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
91. Cecchi, N.; Giannotta, J.A.; Barcellini, W.; Fattizzo, B. A case of severe aplastic anaemia after SARS-CoV-2 vaccination. *Br. J. Haematol.* **2022**, *196*, 1334–1336. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
92. Walter, A.; Kraemer, M. A neurologist’s rhombencephalitis after comirnaty vaccination. A change of perspective. *Neurol. Res. Pract.* **2021**, *3*, 56. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
93. Khayat-Khoei, M.; Bhattacharyya, S.; Katz, J.; Harrison, D.; Tauhid, S.; Brusio, P.; Houtchens, M.K.; Edwards, K.R.; Bakshi, R. COVID-19 mRNA vaccination leading to CNS inflammation: A case series. *J. Neurol.* **2022**, *269*, 1093–1106. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
94. Carubbi, F.; Alunno, A.; Santilli, J.; Natali, L.; Mancini, B.; Di Gregorio, N.; Del Pinto, R.; Viscido, A.; Grassi, D.; Ferri, C. Immune-mediated inflammatory diseases after anti-SARS-CoV-2 vaccines: New diagnoses and disease flares. *RMD Open* **2022**, *8*, e002460. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Nahra, V.; Makandura, M.; Anthony, D.D.; Mattar, M. A Case Series on the COVID-19 Vaccines and Possible Immune-Related Adverse Events: A New Challenge for the Rheumatologists. *Cureus* **2022**, *14*, e29660. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Safary, A.; Esalatmanesh, K.; Eftekharsadat, A.T.; Jafari Nakjavani, M.R.; Khabbazi, A. Autoimmune inflammatory rheumatic diseases post-COVID-19 vaccination. *Int. Immunopharmacol.* **2022**, *110*, 109061. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Tan, C.-Y.; Toh, T.-H.; Toh, Y.-F.; Wong, K.-T.; Shahrizaila, N.; Goh, K.-J. A temporal association between COVID-19 vaccination and immune-mediated necrotizing myopathy. *Muscle Nerve* **2022**, *65*, E24–E26. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Accorsi, E.K.; Chochua, S.; Moline, H.L.; Hall, M.; Hersh, A.L.; Shah, S.S.; Britton, A.; Hawkins, P.A.; Xing, W.; Onukwube Okaro, J.; et al. Pediatric Brain Abscesses, Epidural Empyemas, and Subdural Empyemas Associated with Streptococcus Species—United

- States, January 2016–August 2022. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2022**, 71, 1169–1173. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Yoo, H.; Kim, S.Y.; Park, M.S.; Jeong, S.H.; Park, S.W.; Lee, H.L.; Lee, H.K.; Yang, S.H.; Jegal, Y.; Yoo, J.W.; et al. COVID-19 Vaccine-Associated Pneumonitis in the Republic of Korea: A Nationwide Multicenter Survey. *J. Korean Med. Sci.* **2023**, 38, e106. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
100. To Evaluate the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of BNT162b2 against COVID-19 in Healthy Pregnant Women 18 Years of Age and Older. Identifier: NCT04754594. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT04754594> (accessed on 9 June 2023).
101. Cao, Z.; Wu, Y.; Faucon, E.; Sabatier, J.M. SARS-CoV-2 & Covid-19: Key-Roles of the ‘Renin-Angiotensin’ System/Vitamin D Impacting Drug and Vaccine Developments. *Infect. Disord. Drug Targets* **2020**, 20, 348–349. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. El-Arif, G.; Farhat, A.; Khazaal, S.; Annweiler, C.; Kovacic, H.; Wu, Y.; Cao, Z.; Fajloun, Z.; Khattar, Z.A.; Sabatier, J.M. The Renin-Angiotensin System: A Key Role in SARS-CoV-2-Induced COVID-19. *Molecules* **2021**, 26, 6945. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
103. El-Arif, G.; Khazaal, S.; Farhat, A.; Harb, J.; Annweiler, C.; Wu, Y.; Cao, Z.; Kovacic, H.; Abi Khattar, Z.; Fajloun, Z.; et al. Angiotensin II Type I Receptor (AT1R): The Gate towards COVID-19-Associated Diseases. *Molecules* **2022**, 27, 2048. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
104. Wang, S.; Guo, F.; Liu, K.; Wang, H.; Rao, S.; Yang, P.; Jiang, C. Endocytosis of the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein together with virus receptor ACE2. *Virus Res.* **2008**, 136, 8–15. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
105. Moghaddar, M.; Radman, R.; Macreadie, I. Severity, Pathogenicity and Transmissibility of Delta and Lambda Variants of SARS-CoV-2, Toxicity of Spike Protein and Possibilities for Future Prevention of COVID-19. *Microorganisms* **2021**, 9, 2167. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
106. Almehtdi, A.M.; Khoder, G.; Alchakee, A.S.; Alsayyid, A.T.; Sarg, N.H.; Soliman, S.S. SARS-CoV-2 spike protein: Pathogenesis, vaccines, and potential therapies. *Infection* **2021**, 49, 855–876. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
107. Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C.R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ. Res.* **2021**, 128, 1323–1326. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
108. Letarov, A.V.; Babenko, V.V.; Kulikov, E.E. Free SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Particles May Play a Role in the Pathogenesis of COVID-19 Infection. *Biochem. Mosc.* **2021**, 86, 257–261. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Wei, J.; Hui, A.M. The paradigm shift in treatment from COVID-19 to oncology with mRNA vaccines. *Cancer Treat. Rev.* **2022**, 107, 102405. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
110. Lorentzen, C.L.; Haanen, J.B.; Met, Ö.; Svane, I.M. Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncol.* **2022**, 23, e450–e458. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
111. Sebastian, M.; Schröder, A.; Scheel, B.; Hong, H.S.; Muth, A.; von Boehmer, L.; Zippelius, A.; Mayer, F.; Reck, M.; Atanackovic, D.; et al. A phase I/IIa study of the mRNA-based cancer immunotherapy CV9201 in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2019**, 68, 799–812. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
112. Stenzl, A.; Feyerabend, S.; Syndikus, I.; Sarosiek, T.; Kübler, H.; Heidenreich, A.; Cathomas, R.; Grüllich, C.; Loriot, Y.; Perez Gracia, S.L.; et al. 1149P—Results of the randomized, placebo-controlled phase I/IIb trial of CV9104, an mRNA-based cancer immunotherapy, in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *Ann. Oncol.* **2017**, 28 (Suppl. S5), v408–v409. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
113. Aldrich, C.; Leroux-Roels, I.; Huang, K.B.; Bica, M.A.; Loeliger, E.; Schoenborn-Kellenberger, O.; Walz, L.; Leroux-Roels, G.; von Sonnenburg, F.; Oostvogels, L. Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid

- nanoparticles in human volunteers: A phase 1 trial. *Vaccine* **2021**, 39, 1310–1318. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Bahl, K.; Senn, J.J.; Yuzhakov, O.; Bulychev, A.; Brito, L.A.; Hassett, K.J.; Laska, M.E.; Smith, M.; Almarsson, Ö.; Thompson, J.; et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol. Ther.* **2017**, 25, 1316–1327. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 115. Van Gulck, E.; Vlieghe, E.; Vekemans, M.; Van Tendeloo, V.F.; Van De Velde, A.; Smits, E.; Anguille, S.; Cools, N.; Goossens, H.; Mertens, L.; et al. mRNA-based dendritic cell vaccination induces potent antiviral T-cell responses in HIV-1-infected patients. *AIDS* **2012**, 26, F1–F12. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 116. Gandhi, R.T.; Kwon, D.S.; Macklin, E.A.; Shopis, J.R.; McLean, A.P.; McBrine, N.; Flynn, T.; Peter, L.; Sbrolla, A.; Kaufmann, D.E.; et al. Immunization of HIV-1-Infected Persons with Autologous Dendritic Cells Transfected with mRNA Encoding HIV-1 Gag and Nef: Results of a Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2016**, 71, 246–253. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 117. WHO Statement on the Fifteenth Meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 Pandemic. 5 May 2023. Available online: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic) (accessed on 14 June 2023).
 118. EMEA/CHMP/VWP164653/05 Rev.1 Date for Coming into Operation. 1 August 2023. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/clinical-evaluation-new-vaccines-scientific-guideline> (accessed on 14 June 2023).
 119. Knezevic, I.; Liu, M.A.; Peden, K.; Zhou, T.; Kang, H.-N. Development of mRNA Vaccines: Scientific and Regulatory Issues. *Vaccines* **2021**, 9, 81. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]