

L'ARN messenger la nouvelle star thérapeutique du 21^{ème} siècle

Messenger RNA, the new therapeutic star of the 21st century

Nouha Bouayed Abdelmoula

Service de la Médecine de précision
LR23ES07, Faculté de Médecine de
Sfax, Tunisie

Reçu le 16 juin 2023
accepté le 23 novembre 2023

Auteur Correspondant

Professeur Nouha Bouayed Abdelmoula
Génomique des Signalopathies

Adresse

Service de la Médecine UR17ES36,
Faculté de Médecine de Sfax, Tunisie

Courriel

nouha_abdelmoulabouayed@yahoo.fr

Résumé

L'ARN messenger s'impose comme une technologie thérapeutique révolutionnaire et polyvalente, ouvrant de nouvelles perspectives dans la lutte contre le cancer, les maladies monogéniques rares et bien d'autres affections immunologiques et infectieuses. Cette avancée s'est accélérée grâce à la pandémie de la COVID-19, qui a considérablement accéléré l'application de la technologie de l'ARN messenger pour le développement de médicaments à ARNm, tout en mettant en évidence le potentiel des vaccins à ARNm. Cette synthèse explore la technologie de l'ARNm, ses principales étapes d'optimisation et ses applications prometteuses. Nous mettrons l'accent sur son rôle en oncologie et dans le domaine des maladies rares, ainsi que sur son potentiel d'innovation pour l'avenir de la médecine de la lutte contre le cancer.

Mots-clés: Cancer, ARN messenger, Technologie ARNm, Vaccin ARNm, Maladies rares

Abstract

Messenger RNA is establishing itself as a revolutionary and versatile therapeutic technology, opening up new prospects in the fight against cancer, rare monogenic diseases and many other immunological and infectious conditions. This breakthrough was accelerated by the COVID-19 pandemic, which dramatically accelerated the application of messenger RNA technology for the development of mRNA drugs, while also highlighting the potential of mRNA vaccines. This synthesis explores mRNA technology, its main optimization steps and promising applications. We will focus on its role in oncology and rare diseases, as well as its innovative potential for the future of cancer medicine.

Keywords : Cancer, Messenger RNA, mRNA technology, mRNA vaccine, Rare diseases.

INTRODUCTION

L'ARN messenger (ARNm), longtemps reconnu pour son immense potentiel thérapeutique, a récemment confirmé sa pertinence en tant que composante essentielle des thérapies anticancéreuses et des traitements de substitution protéique. L'épidémie de COVID-19 a joué un rôle considérable dans l'accélération de l'application de la technologie de l'ARNm pour le développement des ARNm médicaments (1). Désormais considéré comme une nouvelle arme de taille dans la lutte contre le cancer, l'ARNm émerge également comme un espoir pour le traitement des maladies rares (2). Alors que l'approche vaccinale cible en particulier l'environnement permissif qui favorise le développement du cancer, l'objectif principal pour le traitement des maladies génétiques rares est de restaurer l'activité d'une protéine défectueuse en administrant régulièrement une copie saine de l'ARNm aux cellules responsables de la production de la protéine tronquée. Dans le cadre de cet article, nous entreprendrons d'abord un bref rappel historique sur les ARN messagers et non messagers, avant d'explorer les fondements, les mécanismes d'action, les défis et les stratégies d'amélioration de la technologie ARNm. En conclusion de cette mise au point, nous mettrons en lumière les diverses applications thérapeutiques des vaccins à ARNm, ainsi que leurs indications potentielles en oncologie et dans d'autres domaines médicaux.

La technologie ARN messenger et ses applications thérapeutiques

1. Rappel historique

1.1. L'ARN messenger

L'ARNm, une macromolécule appartenant à la famille des acides nucléiques, se distingue par sa labilité, sa dégradation rapide et sa brève durée de vie (3). Son rôle physiologique a été forgé par des jalons importants au fil du temps. Après la découverte des acides nucléiques en 1868, l'existence de l'ARN a été confirmée en 1940, et la synthèse de l'ARN et de l'ADN a été réalisée en 1959. Entre 1960 et 1965, en France, la conceptualisation de l'ARNm et la compréhension de son rôle de régulation dans l'expression génique ont valu aux Professeurs Jack Monod et François Jacob le 22ème Prix Nobel de médecine français en 1965 (4).

Ce n'est qu'à partir des années 90 que la production de protéines à partir d'ARNm injecté chez des animaux a été démontrée (5). L'ère de la médecine basée sur l'ARN a été officiellement inaugurée en 2004 avec la commercialisation du premier médicament à base d'ARN ciblant une protéine, utilisant des oligonucléotides antisens (OAS) pour lutter contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge (6). Depuis, l'utilisation des

ARN thérapeutiques a connu un essor significatif en oncologie (7). Une autre stratégie dans la lutte antitumorale a impliqué l'utilisation d'ARN dans le cadre de la vaccination, visant à renforcer l'immunité contre les cancers. Cette approche a connu des succès notables, notamment avec l'utilisation de l'ARNm codant pour l'antigène Prostate Specific Antigen (PSA), qui a été testé aux États-Unis dans le traitement du cancer de la prostate, conduisant à la commercialisation du vaccin Sipuleucel T en 2009 (8). Ensuite, en 2009, des essais similaires ont été menés pour traiter les mélanomes, avec un vaccin contenant trois ARNm conçus pour améliorer l'efficacité des cellules dendritiques chez les patients atteints d'une forme avancée de mélanome. Cela a finalement abouti en 2010 au tout premier essai clinique d'un médicament à base d'ARN pour le mélanome cutané (9). Toutefois, il a fallu attendre jusqu'à 2020-2021 pour voir la confirmation de l'efficacité et de l'innocuité de deux vaccins à ARNm contre la covid19, le vaccin Pfizer-BioNTech (BNT162b2) et le vaccin Moderna COVID-19 (mRNA-1273), qui ont obtenu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis (FDA) pour une autorisation d'utilisation d'urgence (10).

1.2. Les ARN non messagers

Au-delà de l'ARNm, les ARN non codants (ARNnc) jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique et sont impliqués dans un large éventail de maladies humaines (11-13). Les ARN interférents se démarquent par leur capacité à se lier spécifiquement aux ARNm, ce qui entraîne l'arrêt de leur traduction en protéines, un accomplissement qui a été honoré par le Prix Nobel de médecine en 2006.

Les ARNnc suscitent un intérêt persistant en médecine, notamment pour les thérapies ciblées contre le cancer. Alors que la majorité de la littérature contemporaine se concentre sur les microARN (miARN) et les petits ARN interférents (siARN) dans le contexte du cancer, d'autres types d'ARNnc semblent également jouer un rôle essentiel dans cette maladie, offrant ainsi des perspectives thérapeutiques prometteuses (14-16). Le vaste éventail d'options pour l'utilisation thérapeutique de l'ARN distingue les médicaments à base d'ARN, qu'ils aient déjà été approuvés pour une utilisation clinique ou qu'ils soient en cours de recherche ou d'essais précliniques, par un aspect significatif : l'ARN n'est pas seulement la cible, mais peut lui-même devenir un médicament (17-18). Les thérapies à base d'ARN sont classées en plusieurs catégories en fonction de leurs modes d'action et de leurs objectifs thérapeutiques (19). Nous citons : Les thérapies basées sur les ARN interférent (ARNi) conçus pour inhiber la traduction des ARNm en protéines en se liant spécifiquement à ces ARNm cibles.

Cela entraîne la réduction de la production de la protéine associée.

Les thérapies basées sur microARN (miARN) et petits ARN interférents (siARN) qui sont de petites molécules d'ARN qui régulent l'expression des gènes en se liant à des ARNm cibles. Les miARN ciblent généralement plusieurs gènes, tandis que les siARN ont une spécificité de cible plus stricte. Si les siARN réduisent au silence les gènes ciblés en perturbant les ARNm avant la traduction (avec une spécificité de cible très stricte), les miARN limitent l'expression du gène ciblé en restreignant la transformation des ARNm et en favorisant la désintégration des ARNm.

Les thérapies basées sur les ARN antisens et oligonucléotides antisens (ASO) conçues pour se lier spécifiquement à l'ARNm complémentaire et moduler son expression. Ils peuvent inhiber la traduction de l'ARNm ou induire sa dégradation.

Les thérapies basées sur l'ARN circulaire (circARN) dépourvu d'extrémités libres ayant la capacité de réguler l'expression des gènes en agissant comme des éponges pour les miARN, inhibant ainsi leur action sur les ARNm cibles.

Les thérapies basées sur l'ARN messenger (ARNm) ou vaccins à ARNm fournissent des instructions aux cellules pour produire des protéines virales ou cibles, stimulant ainsi une réponse immunitaire ou favorisant la production de protéines thérapeutiques (vaccin ARNm à visée thérapeutique ou curative).

Le dernier type d'approche thérapeutique où l'ARN médicament est l'ARN messenger est la thérapie que nous allons explorer dans la suite de cette revue, en mettant l'accent sur la technologie ARNm et les stratégies de son optimisation.

2. L'ARN messenger la nouvelle star thérapeutique

L'ARNm avait fait l'objet d'études depuis plusieurs années déjà. À la fin de l'année 1987, Robert Malone a réalisé une expérience révolutionnaire en mélangeant des brins d'ARNm avec des gouttelettes de graisse, ce qui a permis aux cellules humaines de les absorber et de commencer à produire des protéines à partir de cet ARNm. En 1996, la première étude portant sur un vaccin anticancéreux à base d'ARNm a testé des cellules dendritiques (CD) pulsées avec de l'ARNm *in vitro* (4, 20). Le parcours vers le développement des vaccins à ARNm s'est appuyé sur les efforts de centaines de chercheurs sur une période de plus de 30 ans (4). Cependant, la route vers le succès n'a pas été linéaire, car l'ARNm était considéré comme trop instable et coûteux. En outre, malgré les efforts de recherche considérables consacrés au développement de vaccins contre le cancer, leur transformation en thérapies cliniques efficaces est restée un défi pendant plusieurs décennies en raison

de la diversité des antigènes tumoraux et de la réponse immunitaire relativement faible. Aujourd'hui, grâce aux progrès technologiques, la structure, la stabilité, les plateformes et les méthodes d'administration de l'ARNm ont été optimisées. De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer les traitements vaccinaux à ARNm (18, 21). De nos jours, plusieurs stratégies sont envisageables pour exploiter l'ARNm en tant que médicament anticancéreux. L'approche vaccinale, en particulier, vise à perturber l'environnement favorable au développement du cancer en activant la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Les vaccins à base d'ARNm pour l'immunothérapie du cancer ne préviennent pas l'apparition du cancer, mais ils ont pour objectif de détruire les cellules tumorales chez le patient. Le principal défi réside dans le développement de méthodes permettant de délivrer les molécules d'ARNm de manière ciblée, en les dirigeant vers les tissus appropriés, les cellules spécifiques, voire les compartiments cellulaires pertinents. En plus des vaccins à ARNm anticancéreux, d'autres approches d'immunothérapie pourraient être combinées pour obtenir un effet thérapeutique oncologique plus complet (22).

3. La technologie ARNm en cancérologie

Les immunothérapies anticancéreuses basées sur l'ARNm partagent un concept similaire avec les vaccins contre la COVID-19. Dans ce processus, l'ARNm est synthétisé et injecté dans l'organisme, transmettant ainsi des instructions aux cellules immunitaires pour qu'elles ciblent spécifiquement les marqueurs apportés par l'ARNm. Ces cellules immunitaires sont ainsi activées pour attaquer sélectivement les cellules tumorales (22).

La technologie des vaccins à base d'ARNm a été largement étudiée pour le traitement du cancer en raison de sa capacité à déclencher une réponse puissante des lymphocytes T, de sa nature bien tolérée et de sa capacité à être conçue de manière personnalisée. Les vaccins à ARNm ont la capacité de coder et d'exprimer les Antigènes Associés aux Tumeurs (AAT) et les Antigènes Spécifiques aux Tumeurs (AST), ainsi que les cytokines associées. Les vaccins ciblant les AAT ou les AST peuvent spécifiquement attaquer et détruire les cellules tumorales malignes qui expriment fortement ces antigènes, en stimulant le système immunitaire pour remplir des fonctions antitumorales. Ce processus implique une induction de l'immunité adaptative. Les protéines codées par l'ARNm sont traduites et captées par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), qui présentent ensuite les antigènes aux lymphocytes T CD4+ via le système de compatibilité majeure de type II (CMH II), tout en les présentant de manière croisée au CMH I sur les lymphocytes T CD8+. Ces vaccins ont ainsi la capacité de provoquer une éradication durable

des tumeurs grâce à la mémoire immunitaire. La réponse immunitaire adaptative induite par les vaccins à ARNm peut englober une stimulation à la fois de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire, où les cellules T CD4⁺ renforcent les effets antitumoraux des cellules B, augmentant ainsi l'adaptabilité de ces vaccins à diverses maladies et à différents patients (22, 23).

Les avantages clés de l'ARNm par rapport à l'ADN en tant que stratégie de vaccination contre le cancer résident dans sa capacité à être traduit dans les cellules en division ou non. L'ARNm n'a besoin que d'être internalisé dans le cytoplasme, suivi d'une traduction en une seule étape en antigène d'intérêt. De plus, le taux et l'amplitude de l'expression protéique de l'ARNm sont généralement plus élevés que ceux des vaccins à ADN. Les avantages des vaccins à ARNm comprennent également une production rapide, une flexibilité, un coût relativement bas, la capacité à générer une réponse immunitaire protectrice robuste, ainsi qu'une sécurité accrue, car l'ARNm ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte, contrairement aux vaccins à ADN (22).

Bien que la production rapide de grandes quantités de vaccins anticancéreux à ARNm précis et personnalisés représente une modalité thérapeutique prometteuse, le véritable défi dans le traitement du cancer réside dans l'identification de la protéine cible pour lutter contre la tumeur. Il est essentiel de garantir que le ciblage n'active pas le système immunitaire contre des cellules saines qui pourraient également exprimer la protéine codée par les ARNm vaccinaux (23, 24). C'est pourquoi les chercheurs s'efforcent de cibler spécifiquement certaines des mutations génétiques présentes dans les cellules cancéreuses. De plus, étant donné que chaque cancer présente des caractéristiques distinctes et que les réponses immunitaires des individus atteints sont variables, l'objectif est de développer des approches personnalisées pour ces vaccins à ARNm (25).

3.1. La stratégie de préparation du vaccin

Le chemin qui a conduit au succès des deux vaccins à ARN messager les plus importants et les plus rentables de l'histoire humaine, qui sont les vaccins antiCOVID-19 administrés à des centaines de millions de personnes dans le monde, n'a pas été linéaire. Après les expériences pionnières de Malone (4, 20), qui s'étaient elles-mêmes inspirées des travaux d'autres chercheurs, des années de recherche étaient nécessaires pour surmonter l'idée préconçue que l'ARNm était trop instable pour servir de base à un médicament ou à un vaccin. Divers laboratoires universitaires et entreprises se sont donc attelés à la quête de la formule idéale de graisses (plateforme d'administration) et d'acides nucléiques (ARNm) - les éléments constitutifs du vaccin à ARNm.

Les vaccins à ARN messager d'aujourd'hui intègrent

des innovations qui ont été développées progressivement pour établir une technologie à ARN messager robuste. Initialement, les chercheurs ont dû relever des défis liés à la stabilité de l'ARNm et à sa capacité à induire une réponse immunitaire forte et durable. Des améliorations ont été apportées à la conception des molécules d'ARNm produites par transcription *in vitro* (TIV). Par exemple, l'utilisation de modèles de nucléosides modifiés pour accroître la stabilité. En effet, le remplacement de l'uridine dans l'ARNm transcrit *in vitro* par la pseudouridine a permis de renforcer la stabilité de l'ARN et, dans le même temps, diminuer la réponse immunitaire anti-ARN (26). Au cours du développement des vaccins à ARNm approuvés contre la COVID-19 en 2020, Pfizer/BioNTech et Moderna ont mis en œuvre des technologies similaires et ont utilisé un ARNm codant pour une version préfusion modifiée par nucléoside de l'antigène de la pointe (S-2P), qui a été encapsulée dans des nanoparticules lipidiques (LNP) cationiques ionisables pour l'administration. Ces deux formulations ont déclenché une réponse immunitaire robuste à la fois chez les modèles animaux et les individus vaccinés. La réponse immunitaire a été marquée par une production significative d'anticorps neutralisants spécifiques à la protéine «spike» présente à la surface du virus SARS-CoV-2, ainsi que par des niveaux intermédiaires de réponses des lymphocytes T. Après la première vaccination, des réponses immunitaires innées modérées, comprenant des réponses antivirales et interféron, ont été observées, tandis que des réponses inflammatoires beaucoup plus fortes ont été constatées après l'administration de la deuxième dose, servant de rappel (27).

En outre, des améliorations significatives ont été apportées aux méthodes d'administration ou de délivrance de l'ARNm pour garantir son efficacité dans la transmission aux cellules du système immunitaire. Deux défis majeurs ont dû être surmontés. Premièrement, l'ARNm nu est rapidement dégradé par les nucléases extracellulaires (enzymes RNases) et n'est pas efficacement internalisé par les cellules présentatrices des antigènes (CPA). Deuxièmement, l'ARNm possède une immunogénicité intrinsèque, susceptible d'activer la voie de l'interféron (INF) et de déclencher l'immunité innée. Bien que cette immunogénicité intrinsèque puisse agir comme un adjuvant en stimulant la réponse immunitaire, elle paradoxalement facilite la dégradation de l'ARNm, réduisant ainsi l'expression de l'antigène. En plus, les impuretés, principalement l'ARN double brin généré lors de la TIV, amplifient l'activation de l'immunité innée, limitant davantage la traduction de l'ARNm (18, 22). Pour résoudre les problèmes liés à l'inflammation et à l'immunité innée, de nombreuses autres amé-

liorations ont également été apportées (18, 28, 29). Ainsi, l'optimisation de la technologie ARNm a abouti à une méthode de production bien établie. Celle-ci implique la modification du cap à cinq amorces (5'Cap), l'optimisation des régions UTR non traduites, l'optimisation des codons du cadre de lecture ouvert (ORF), la modification de la queue du poly A (polyadénylation à l'extrémité 3'), l'utilisation d'ARNm transcrit in vitro modifié produisant un pseudo-uracile qui

échappe à la détection par le système immunitaire, la purification de l'ARNm TIV pour réduire le signal des ARNm exogènes, atténuant ainsi la réponse inflammatoire et améliorant la traduction des ARNm. L'impact de l'interféron I (INF I) a également été pris en considération pour améliorer la vaccination, tout comme l'optimisation du vaccin à ARN messager auto-amplifié (18, 22) (figure 1).

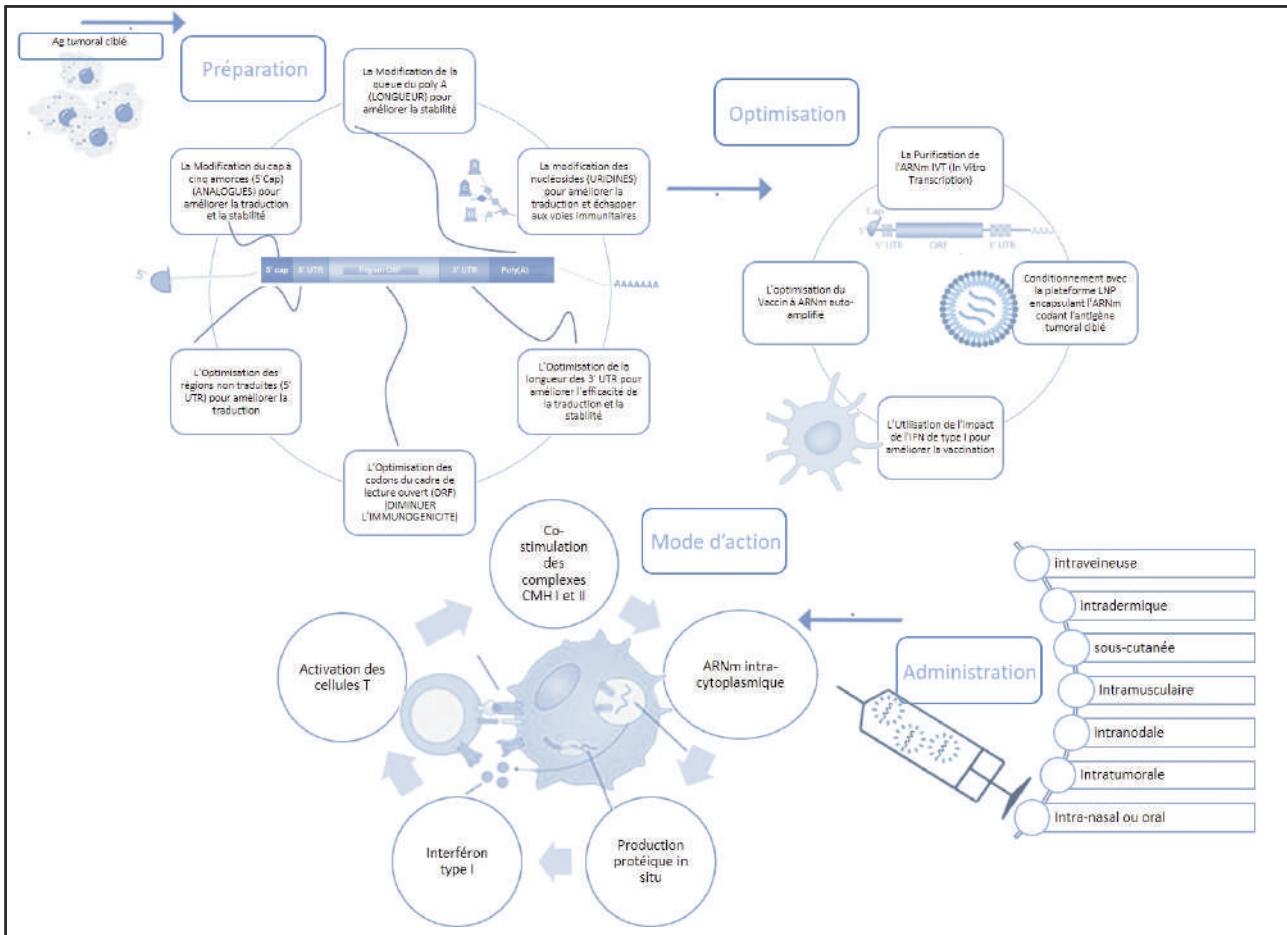


Figure 1 : La technologie ARN messager pour les vaccins anti-cancer

3.2. Les plateformes d'administration

L'un des principaux défis de la thérapie par ARNm résidait dans la nécessité de disposer de systèmes d'administration efficaces. En effet, l'ARNm nu avait du mal à traverser la membrane cellulaire en raison de sa charge négative dense et de sa grande taille (104-106 Da). De plus, l'ARNm lui-même était une molécule instable, sujette à une dégradation facile, ce qui entravait l'induction d'une réponse immunitaire. Il était donc impératif de développer des systèmes ou des plateformes d'administration appropriées (30, 31). Historiquement, plusieurs approches ont été utilisées. Les premières don-

nées relatives à l'utilisation de l'ARNm en tant que plate-forme vaccinale ont démontré que l'injection intramusculaire directe d'ARNm codant pour des gènes rapporteurs induisait l'expression in vivo de ces gènes rapporteurs chez la souris. D'autres systèmes de livraison mécaniques, tels que l'électroporation, le canon à gènes (gene gun) ainsi que les micro-aiguilles, et des méthodes de livraison impliquant des cellules dendritiques chargées ex vivo, ou encore des systèmes de livraison formulés avec la protamine, les lipides cationiques ou les polymères, ont été utilisés pour administrer l'ARNm à des fins de vaccination. Cependant, ces

méthodes se sont révélées complexes, coûteuses ou inapplicables à l'usage humain (32). Ultérieurement, de nombreuses autres solutions, à la fois classiques et innovantes, ont été mises au point, notamment les plates-formes d'administration utilisant les LNP composées de lipides cationiques ionisables, de cholestérol, de phospholipides et de polyéthylène glycol qui ont fait leurs preuves. Les vaccins à ARNm approuvés par la FDA contre la COVID-19 reposent sur de telles plates-formes, et ils ont démontré une efficacité équivalente, voire supérieure, en ce qui concerne l'immunité à médiation cellulaire et humorale par rapport à d'autres vaccins. À côté des LNP, d'autres systèmes d'administration nanométriques dont les liposomes, les complexes lipidiques polymériques, les micelles polymériques auto-assemblées, les nano-hydrogels et les nanoparticules métalliques, etc... ont aussi été décrits et d'autres. Cependant, il convient de noter que bien que les LNP et les liposomes aient longtemps été considérés comme les outils les plus prometteurs, de plus en plus de rapports font état d'effets secondaires induits par les LNP (18, 19, 22, 23, 30, 31).

Au cours des diverses études et essais cliniques de thérapie vaccinale anticancéreuse à base d'ARNm visant à induire une réponse antitumorale, plusieurs plateformes d'administration ont été utilisées et résumées par Lorentzen (33). Les formulations de l'ARNm avec les lipoplexes, notamment la plateforme FixVac de BioNTech, semblent être parmi les méthodes les plus efficaces pour les vaccins anticancéreux. Les essais cliniques de vaccins anticancéreux à base de cellules dendritiques chargées d'ARNm *ex vivo* ont montré des réponses limitées, mais certaines études suggèrent un potentiel bénéfique dans la prévention de la rechute et la prolongation de la survie. En effet bien que l'approche soit complexe, elle semble potentiellement prometteuse pour stimuler des réponses immunitaires spécifiques.

3.3. La voie d'administration

Les matériaux d'administration de l'ARNm jouent un rôle essentiel en assurant une délivrance sécurisée et efficace de l'ARNm au sein des cellules, tout en minimisant les effets indésirables tels que le rejet immunitaire et la toxicité hépatique. L'émergence de divers effets secondaires a suscité un vif intérêt pour le développement de systèmes d'administration sûrs permettant l'émulation des mécanismes naturels de délivrance. Dans le domaine des vaccins anticancéreux à base d'ARNm, plusieurs voies d'administration sont couramment utilisées, notamment l'administration intraveineuse, intradermique, sous-cutanée, intramusculaire, intranodale et intratumorale. Cependant, il reste difficile de prédire de manière précise quelle voie est la plus

appropriée pour un vaccin donné. C'est pourquoi des études comparatives directes sont recommandées pour orienter le choix de la meilleure voie d'administration. L'administration intraveineuse, bien que permettant d'acheminer un volume de vaccin plus important directement vers les organes lymphatiques, est associée à un risque accru de toxicité systémique. À l'inverse, l'administration intramusculaire offre un volume d'injection relativement plus élevé par rapport aux voies intradermique et sous-cutanée, et occasionne des effets secondaires locaux moins importants. L'administration intranodale, malgré l'utilisation de petits volumes de vaccin, se distingue par une efficacité de délivrance élevée, ce qui en fait un choix privilégié pour les vaccins à ARNm codant pour des molécules immuno-costimulantes dans le cadre d'une thérapie immuno-adjuvante. Toutefois, ces deux voies impliquent des procédures relativement complexes. En parallèle, des études précliniques ont révélé des résultats prometteurs pour les vaccins anticancéreux à ARNm administrés par voie intranasale, et des tentatives d'administration orale ont également été entreprises (18, 22).

3.4. L'optimisation de la réponse immunitaire

Dans le développement des vaccins à ARN messenger, la modulation de l'immunogénicité est un problème important. Bien que l'ARNm obtenu par transcription *in vitro* montre un certain potentiel d'auto-adjuvant, il n'est généralement pas suffisant pour induire une immunité protectrice complète, nécessitant plutôt des optimisations pour atteindre une efficacité optimale. Plusieurs stratégies ont été mises en place pour utiliser des adjuvants dans les vaccins à ARN messenger, afin de moduler leur immunogénicité.

Traditionnellement, la cytotoxicité médiée par les cellules, un phénomène découlant du concept d'immuno-surveillance, a été le mécanisme central de l'effet anti-tumoral des vaccins thérapeutiques. Les vaccins anticancéreux à ARNm induisent une réponse immunitaire adaptative et ont principalement pour objectif de stimuler les cellules T capables de cibler et détruire les cellules tumorales, plutôt que de générer des anticorps. Les cellules T ont la capacité de développer une mémoire immunitaire au fil du temps, ce qui est crucial pour assurer une réponse durable contre le cancer. En raison de son effet auto-adjuvant, l'ARNm peut présenter certaines propriétés similaires à l'ARNm viral lorsqu'il sert de vecteur pour les gènes exogènes. Dans ce cas, l'ARNm peut être reconnu par les CPA, qui activent ensuite les récepteurs de reconnaissance de motifs appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui font partie intégrante du système immunitaire inné, tels que les récepteurs Toll-like 3 (TLR3), Toll-like 7 (TLR7) et Toll-like 8 (TLR8) et ce grâce aux motifs moléculaires

associés aux agents pathogènes, également appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Les ARNm exogènes sont intrinsèquement immunostimulants, car ils sont reconnus par divers PRRs présents à la surface des cellules, dans les endosomes et dans le cytosol. La reconnaissance des ARNm transcrit in vitro à l'intérieur des endosomes est principalement médiée par les récepteurs Toll-like (TLR7 et TLR8), un type de PRRs, ce qui conduit à l'activation des voies de l'interféron de type 1 (IFN1) et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Dans le cytosol, les ARNm exo-

gènes sont détectés par d'autres familles de PRR, notamment les récepteurs de type Nod (Nod-like receptors, NLR) dont Nod2, et les récepteurs cytoplasmiques RLR dont RIG-I (RIG-I-like receptors pour Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptor), MDA5 (Melanoma differentiation-associated gene 5) et LGP2 (Laboratory of genetics and physiology 2). Ces PRRs peuvent détecter différents types d'ARN, notamment l'ARN double brin et l'ARN monocaténaire, bloquant la traduction de l'ARNm (figures 2 et 3). L'activation de plusieurs PRRs et la production d'IFN1 peuvent être

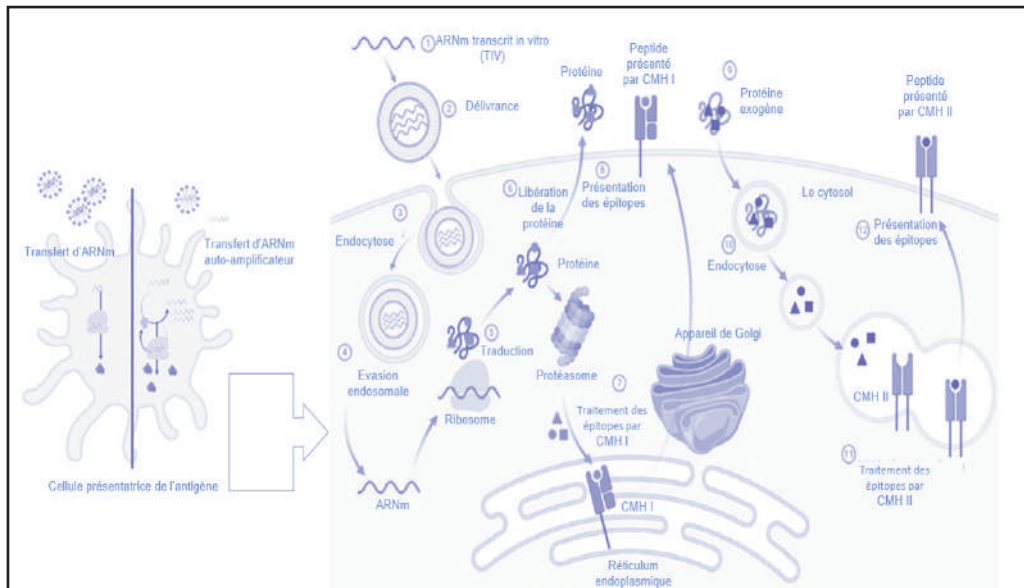


Figure 2 : Mécanisme d'action des vaccins ARNm au niveau cellulaire (adaptée d'après Biotech.bae)

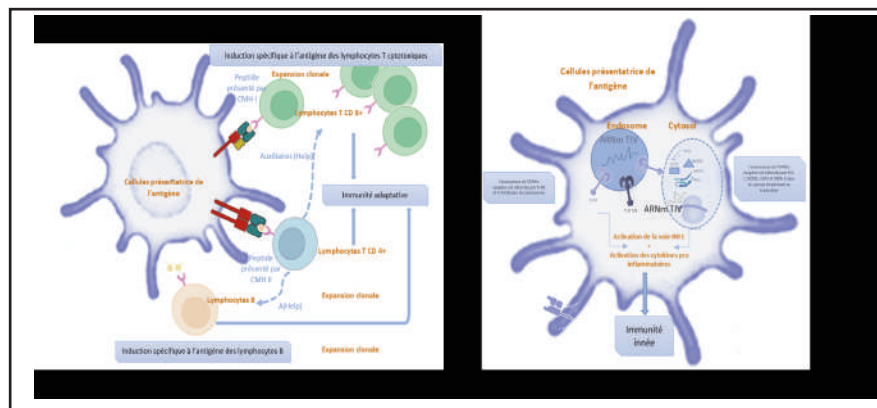


Figure 3 : L'activation immunitaire adaptative et innée par les vaccins ARNm messenger

ainsi bénéfiques ou néfastes pour l'immunothérapie anticancéreuse. Cela peut être bénéfique pour la vaccination car, dans certains cas, l'activation des voies de l'IFN1 stimule l'activation et la maturation des CPA, favorise la présentation de l'antigène et suscite des réponses immunitaires adaptatives robustes. A l'inverse, la détection immunitaire innée des ARN peut être associée à l'inhibition de l'expression de l'antigène, ce qui peut réduire la réponse immunitaire. L'impact paradoxal de l'activation des IFN1 ne se limite pas à l'expression de l'antigène, il a également un effet sur l'activation des cellules T CD8+. Les actions stimulantes ou inhibitrices des IFN1 sur l'activation des cellules T CD8+ peuvent être influencées par les voies d'administration des vaccins anticancéreux à ARNm. L'optimisation de la séquence d'ARNm pour réguler sa propriété d'auto-adjuvantage et sa combinaison avec des adjuvants connus pour renforcer la réponse immunitaire, tout en contrôlant la sur activation de l'immunité ont été rapportées par de nombreuses études. Nous citons comme exemple la plateforme de vaccin RNActive® développée par CureVac AG. Les vaccins RNActive® sont basés sur des molécules d'ARNm conventionnelles qui ont été modifiées et optimisées pour améliorer divers aspects de la molécule, tels que la demi-vie de l'ARNm et l'expression des protéines. Un composant essentiel des vaccins RNActive® est la protamine, un peptide cationique qui forme des complexes avec l'ARN. La combinaison améliore le profil d'expression de l'ARNm et la stimulation immunitaire induite par l'ARNm complexé à la protamine, qui active le récepteur TLR7 (4, 22, 23, 34, 35). Citons aussi l'ARNm co-administré avec des lipides cationiques, qui induit une réponse immunitaire innée médiée par l'IFN1 et des réponses des cellules T CD8+ et favorise les fonctions effectrices cytolytiques dans des modèles murins de tumeurs. À noter que toutes les cellules nucléées ont potentiellement la capacité de traiter des ARNm et de présenter les peptides dérivés sur le CMH I, mais seules les CPA sont capables de présenter des peptides sur le CMH I et le CMH II, ce qui est important pour l'induction de réponses des cellules T CD4+ et des cellules B ainsi que des réponses anticorps (36). Citons aussi le vaccin mRNA-2752 qui est en cours de développement pour le traitement de tumeurs solides récidivantes et réfractaires, notamment le cancer du poumon non à petites cellules, le mélanome, le cancer du sein triple négatif, le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, le cancer urothélial, et les lymphomes non hodgkiniens, y compris le lymphome folliculaire et le lymphome diffus à grandes cellules B. Il est administré par voie intratumorale, c'est-à-dire directement dans la tumeur. Ce candidat thérapeutique développé par ModernaTX, Inc.

est composé de trois ARNm qui codent pour l'OX40L, l'interleukine 23 (IL23) et l'interleukine 36 gamma (IL36G). Il est développé en utilisant la technologie de l'ARN messenger et la plateforme de formulation N1GL conçue pour améliorer la formulation des produits thérapeutiques à base d'ARNm, qui permet de délivrer ces ARNm de manière ciblée pour stimuler la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Ce traitement vise à activer le système immunitaire du patient pour combattre spécifiquement les cellules tumorales. A noter que OX40 (également appelé CD134) et son partenaire de liaison, OX40L (ou CD252), sont des membres de la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR) et de leurs ligands (TNF). Ils sont exprimés sur les lymphocytes T CD4 et CD8 activés, ainsi que sur un certain nombre d'autres cellules lymphoïdes et non lymphoïdes. Les signaux de co-stimulation provenant d'OX40 vers un lymphocyte T conventionnel favorisent leur division et leur survie, ce qui amplifie l'expansion clonale des populations effectrices et mémoire au fur et à mesure de leur génération en réponse à un antigène (36, 37).

En immunothérapie cancéreuse, plusieurs considérations spécifiques doivent être prises en compte pour les réponses immunitaires contre les tumeurs. Celles-ci incluent le moment optimal de l'application du vaccin, le choix de l'antigène cible, la manipulation du microenvironnement de la tumeur et la combinaison éventuelle avec d'autres traitements qui pourraient entraîner des effets anti tumoraux additionnels, voire synergiques. Le principal obstacle dans de nombreux essais cliniques est l'induction efficace de réponses immunitaires par les cellules T, notamment lorsqu'il s'agit de traiter des patients atteints de maladies avancées ou de tumeurs résistantes à la thérapie. Les vaccins anticancéreux sont généralement administrés lorsque la tumeur a atteint une taille raisonnable ou s'est déjà métastasée. Ces cellules cancéreuses ont déjà interagi pendant une plus longue période avec le système immunitaire et peuvent avoir développé des mécanismes intrinsèques ou extrinsèques qui les aident à échapper au système immunitaire et à diminuer l'effet thérapeutique de l'immunité anticancéreuse induite par le vaccin. Par conséquent, l'application de l'ARNm à des stades plus précoces de la maladie, tels que pendant la thérapie adjuvante, pourrait améliorer l'efficacité des traitements vaccinaux (36).

Les vaccins à ARNm contre le cancer sont généralement conçus pour cibler les AAT, présents à la fois sur les cellules cancéreuses et sur certaines cellules saines. Ils visent également les AST, qui sont exclusivement présents sur les cellules cancéreuses. Cependant, une catégorie particulièrement cruciale d'AST, résultant de

mutations spécifiques dans les cellules cancéreuses du patient (connue sous le nom de néoantigènes), revêt une importance particulière dans le développement des vaccins ARNm anticancéreuses personnalisées. Les tumeurs accumulent jusqu'à des milliers de mutations génomiques, dont seule une fraction aboutit à la génération de nouveaux épitopes pouvant être reconnus par le système immunitaire, entraînant ainsi l'inhibition de la croissance tumorale. Les progrès dans la technologie de séquençage de nouvelle génération (NGS) permettent de décoder le «mutatome» d'un patient atteint de cancer. L'identification des mutations, basée sur la NGS et couplée à une sélection bioinformatique des cibles pour prédire les mutations immunogènes individuelles dans la tumeur du patient, a considérablement avancé la progression de la thérapie personnalisée contre le cancer. Les vaccins à ARNm codant pour des néoantigènes sont considérés actuellement comme les candidats les plus prometteurs pour les vaccins contre le cancer (18, 19, 23, 36). L'administration d'ARNm porteur d'épitopes antigéniques mutés déclenche des réponses immunitaires robustes des cellules T CD8+ ciblant spécifiquement ces antigènes. Cette réponse immunitaire favorise une régression tumorale efficace et de longue durée. De plus, ces vaccins semblent stimuler la production d'anticorps neutralisants par les cellules auxiliaires folliculaires. Même si les mécanismes précis sous-jacents demeurent partiellement compris, il est établi que ces cellules sont activées par les vaccins à ARNm, conduisant à la génération d'anticorps neutralisants puissants et durables (18, 23, 36).

Les vaccins à ARNm permettent également la combinaison d'ARNm codant pour différents antigènes. Les CD ayant incorporé l'ARNm présentent une variété de peptides liés aux molécules du CMH de classe I et II, ce qui favorise des réponses cellulaires T CD4+ et CD8+ polyclonales. Les formulations vaccinales peuvent inclure des ARNm codant pour des protéines immunomodulatrices, ce qui peut encore améliorer leur efficacité. En résumé, les vaccins à ARNm codant pour deux protéines ou plus, ou pour de longs peptides, permettent d'induire une réponse immunitaire polyclonale étendue, contournant ainsi la restriction aux molécules du CMH (18, 30,36). Actuellement, il existe deux vaccins anticancéreux à ARNm personnalisés, le vaccin ARNm-4157 de Moderna (codant jusqu'à 34 néoantigènes) et le vaccin BNT122 de BioNTech (codant jusqu'à 20 néoantigènes), qui sont en phase II d'essais cliniques. Un essai clinique de phase II avec BNT122 pour le traitement du cancer colorectal est actuellement en cours (Clinical trial NCT04486378) (37). Récemment, Moderna et Merck ont annoncé que l'ARNm-4157/V940 personnalisé, en combinaison avec l'inhibiteur de points de contrôle de Merck & Co, Keytruda

(pembrolizumab), après avoir présenté les résultats positifs des essais cliniques de phase II en décembre 2022, a été désigné par la FDA comme «Thérapie Révolutionnaire» pour le traitement adjuvant des patients atteints de mélanome à haut risque après une résection complète.

4. Applications cliniques des vaccins ARNm

4.1. Applications cliniques des vaccins ARNm contre les cancers

À l'heure actuelle, seuls les vaccins ARNm anti-COVID-19 ont reçu l'autorisation de la FDA. Cependant, les percées en cours dans le domaine du cancer, bien qu'encouragées par la FDA, n'ont pas encore obtenu cette approbation. Jusqu'à présent, de nombreux essais cliniques phases I/II concernant les vaccins à ARNm, répertoriés sur ClinicalTrials.gov et dans diverses revues, ont été menés ou sont en cours pour lutter contre divers types de cancers. Il s'agit notamment du mélanome, des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, des cancers du cerveau, en particulier les glioblastomes, du cancer de la prostate, des cancers hématopoïétiques, y compris les leucémies chroniques et aiguës, les lymphomes et les myélomes, du cancer du poumon non à petites cellules, du cancer de l'ovaire, du cancer du sein, des cancers du système digestif tels que le cancer du pancréas, du foie, du côlon, et bien d'autres organes digestives (33, 36-40).

Selon la fondation française ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) dans une publication du mois de Mai 2023, des résultats récents laissent présager des avancées significatives contre les cancers du pancréas, mais aussi les mélanomes grâce à l'activation du système immunitaire. En nous basant sur l'observation que les survivants à long terme du carcinome canalaire pancréatique (PDAC pour pancreatic ductal adenocarcinoma) développent des réponses spontanées de lymphocytes T dirigées contre des néoantigènes spécifiques à la tumeur, qui ne sont pas partagés entre les patients, l'équipe de Luis A. Rojas *et al.*, (41) a cherché à déterminer si des vaccins individualisés adjuvants pourraient stimuler les lymphocytes T spécifiques des néoantigènes et apporter un bénéfice clinique aux patients atteints de PDAC ayant subi une résection chirurgicale. Ce vaccin à ARNm individualisé a été estimé être en mesure d'induire des lymphocytes T spécifiques des néoantigènes chez les patients atteints de PDAC, ce qui pourrait contribuer à l'élimination des micrométastases et à un retard de la récurrence de la maladie. Afin de tester l'hypothèse de l'équipe, une étude clinique de phase I, qui a consisté en l'administration séquentielle d'atezolizumab (un anticorps monoclonal humanisé anti-PD-L1), d'autogène cevumeran (un vaccin à ARNm individualisé contenant jusqu'à 20 néoantigènes restreints par le CMH I et le CMH II, présentés dans des nanoparti-

cules lipoplex administrées par voie intraveineuse), et de FOLFIRINOX modifié, chez des patients atteints de PDAC ayant subi une résection chirurgicale. Les deux objectifs de cette démarche étaient d'amplifier la réponse des lymphocytes T spécifiques des néoantigènes qui étaient inhibés par la signalisation PD-1 et de préparer les lymphocytes T naïfs à reconnaître les néoantigènes du vaccin (Clinical trial NCT04161755) (41, 42). Concernant le mélanome malin, le mRNA-4157 est le nouveau vaccin personnalisé contre ce cancer basé sur l'ARNm, qui code jusqu'à 34 néoantigènes tumoraux spécifiques au patient. L'essai randomisé en phase 2 ouvert mRNA-4157-P201/Keynote-942 a atteint son critère principal de survie sans récurrence chez les patients atteints de mélanome de stade IIIB/C/D et IV à haut risque ayant subi une résection. L'étude a montré une amélioration statistiquement significative et cliniquement pertinente de la survie sans récurrence dans le traitement combiné par rapport à la monothérapie au pembrolizumab, avec une réduction du risque de récurrence ou de décès de 44 % (43).

4.2. Applications thérapeutiques des vaccins à ARNm au cours des maladies rares

Aux côtés des essais cliniques avancés en immunothérapie anticancéreuse, l'ARNm émerge actuellement comme une nouvelle modalité prometteuse dans la prévention et le traitement de diverses maladies, notamment des affections monogéniques rares, des maladies métaboliques, immunologiques et infectieuses. Pour ce qui est des maladies monogéniques, les approches thérapeutiques basées sur l'ARN englobent à la fois les petits ARN et l'ARNm. L'utilisation des ASO pour moduler l'expression des gènes et de leur ARNm en cas de mutations spécifiques a été décrite pour certaines affections (44). Les stratégies utilisées sont variées, y compris l'approche du saut d'exon, qui est employée dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Cette approche consiste à exclure les exons contenant des variants dont la suppression n'affecte pas le cadre de lecture ouvert, résultant ainsi, sous traitement par ASO, en une protéine dystrophine éditée mais partiellement fonctionnelle (44,45). D'autres méthodes basées sur l'utilisation d'ARNm exogène visent à contourner les séquences mutantes d'un gène pathologique en les remplaçant par un nouvel ARNm chimiquement modifié, rétablissant ainsi la production saine de protéines, comme c'est le cas pour la mucoviscidose (44). Récemment, l'application de la technologie ARNm en tant que nouvelle thérapie, à des fins préventives ou curatives, pour de nombreuses maladies métaboliques héréditaires est devenue de plus en plus courante (45). Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours, notamment pour la porphyrie aiguë intermittente, l'acidémie méthylmalonique, le déficit en ornithi-

ne transcarbamylyase et la glycogénose de type Ia, avec de nombreuses molécules testées, telles que le mRNA3283, le mRNA-3927, le mRNA-3704, le MRT5201 et le mRNA-3745 (45). Malgré certaines difficultés, notamment en ce qui concerne l'efficacité de l'administration, les effets indésirables et la toxicité de ces médicaments, la nouvelle industrie des médicaments à base d'ARNm semble prometteuse. Sur le plan éthique, elle semble susciter moins de controverses que les technologies d'édition génomique basées sur CRISPR-Cas9 et les techniques classiques de thérapie génique impliquant l'utilisation de vecteurs viraux (46, 47).

CONCLUSION

Les traitements basés sur l'ARNm ouvrent la voie à une nouvelle ère de lutte contre le cancer, offrant des armes polyvalentes qui ciblent les cellules tumorales de multiples manières. En s'attaquant directement aux mécanismes fondamentaux du cancer, ces approches révolutionnaires montrent un grand potentiel pour améliorer la survie des patients et réduire les risques de récurrence. Les vaccins à ARNm personnalisés, tels que le mRNA-4157, ont démontré des résultats prometteurs, offrant de l'espoir aux patients atteints de cancers agressifs comme le mélanome. La combinaison de ces vaccins avec d'autres thérapies, telles que l'immunothérapie, ouvre de nouvelles perspectives passionnantes dans la lutte contre le cancer. De plus, ces avancées technologiques ne se limitent pas au cancer. Les thérapies à base d'ARNm ont également ouvert de nouvelles opportunités pour lutter contre les maladies rares, métaboliques, immunologiques et infectieuses. En permettant la production de protéines spécifiques ou le remplacement de protéines manquantes, l'ARNm ouvre la voie à des traitements individualisés pour des affections qui étaient auparavant très difficiles à traiter. Cependant, il est essentiel de noter que ces avancées ne sont que le début d'une révolution thérapeutique en oncologie et en médecine en général. Les défis restent nombreux, notamment en ce qui concerne l'efficacité, les effets secondaires et l'accessibilité de ces traitements. De plus, la personnalisation des thérapies en fonction des caractéristiques génétiques individuelles des patients constitue un domaine en constante évolution qui promet de rendre les traitements encore plus efficaces. À mesure que la recherche se poursuit et que de nouvelles découvertes se multiplient, il devient de plus en plus évident que l'ARNm et les thérapies basées sur la technologie de l'ARNm sont en passe de devenir les stars thérapeutiques du 21^{ème} siècle. Ces avancées promettent une nouvelle ère de soins de santé, caractérisée par des traitements plus efficaces, plus personnalisés et plus accessibles.

REFERENCES

1. Parums DV. Editorial: mRNA Vaccines and Immunotherapy in Oncology: A New Era for Personalized Medicine. *Med Sci Monit.* 2021 ; 17;27:e933088. doi: 10.12659/MSM.933088. .
2. Clarke LA, Amaral MD. What Can RNA-Based Therapy Do for Monogenic Diseases? *Pharmaceutics.* 2023;15(1):260. doi: 10.3390/pharmaceutics15010260; 15(1): 260.
3. Minchin S, Lodge J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem.* 2019;63(4):433-456. doi: 10.1042/EBC 20180038.
4. Dolgin E. The tangled history of mRNA vaccines. *Nature.* 2021;597(7876):318-324. doi: 10.1038/d 41586-021-02483-w.
5. Wang Y, Zhang Z, Luo J, Han X, Wei Y, Wei X. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Mol Cancer.* 2021; 20(1):33. doi: 10.1186/s12943-021- 01311-z.
6. Hastings ML, Krainer AR. RNA therapeutics. *RNA.* 2023; 29(4):393-395. doi: 10.1261/rna.079626.123.
7. Quemener AM, Bachelot L, Forestier A, Donnou-Fournet E, Gilot D, Galibert MD. The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2020; 11(5):e1594. doi: 10.1002/wrna.1594.
8. Anassi E, Ndefo UA. Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P T.* 2011; 36(4):197-202. PMID: 21572775;
9. Turnis ME, Rooney CM. Enhancement of dendritic cells as vaccines for cancer. *Immunotherapy.* 2010; 2(6):847-62. doi: 10.2217/imt.10.56. .
10. Qin S, Tang X, Chen Y, Chen K, Fan N, Xiao *Wet al.* mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):166. doi: 10.1038/s41392-022-01007-w.
11. Bhat AA, Younes SN, Raza SS, Zarif L, Nisar S, Ahmed I, *et al.* Role of non-coding RNA networks in leukemia progression, metastasis and drug resistance. *Mol Cancer.* 2020; 19(1):57. doi: 10.1186/s12943-020- 01175-9.
12. Crouvezier N, Marie AC, Moumné L. Mécanismes d'action et brevetabilité des oligonucléotides thérapeutiques (Mechanisms of action and patentability of therapeutic oligonucleotides). *Med Sci (Paris).* 2023; 39(2):111-118. doi: 10.1051/medsci/2023005. 13.
13. Durr A. Thérapie par ARN anti-sens dans la maladie de Huntington - Un immense espoir et beaucoup d'inconnues (Anti-sense oligonucleotides RNA therapy in Huntington disease: a great promise and many unknowns). *Med Sci (Paris).* 2019; 35(11):834-836. doi: 10.1051/medsci/2019165.
14. López-Fraga M, Martínez T, Jiménez A. RNA interference technologies and therapeutics: from basic research to products. *BioDrugs.* 2009; 23(5):305-332. doi: 10.2165/11318190-000000000-00000. .
15. Yu AM, Choi YH, Tu MJ. RNA Drugs and RNA Targets for Small Molecules: Principles, Progress, and Challenges. *Pharmacol Rev.* 2020; 72(4):862-898. doi: 10.1124/pr.120.019554. .
16. Chen X, Mangala LS, Rodriguez-Aguayo C, Kong X, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer Metastasis Rev.* 2018; 37(1):107-124. doi: 10.1007/s10555-017-9717-6. .
17. Yu AM, Tu MJ. Deliver the promise: RNAs as a new class of molecular entities for therapy and vaccination. *Pharmacol Ther.* 2022; 230:107967. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107967.
18. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018; 17(4):261-279. doi: 10.1038/nrd.2017.243. .
19. Sun H, Zhang Y, Wang G, Yang W, Xu Y. mRNA-Based Therapeutics in Cancer Treatment. *Pharmaceutics.* 2023; 15(2):622. doi: 10.3390/pharmaceutics15020622.
20. Costa VG, Costa SM, Saramago M, Cunha MV, Arraiano CM, Viegas SC, *et al.* Developing New Tools to Fight Human Pathogens: A Journey through the Advances in RNA Technologies. *Microorganisms.* 2022;10(11): 2303. doi: 10.3390/microorganisms10112303.
21. Tay BQ, Wright Q, Ladwa R, Perry C, Leggatt G, Simpson F, *et al.* Evolution of Cancer Vaccines-Challenges, Achievements, and Future Directions. *Vaccines (Basel).* 2021; 9(5):535. doi: 10.3390/vaccines9050535.
22. Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Mol Cancer.* 2021; 20(1):41. doi: 10.1186/s12943-021-01335-5.
23. Deng Z, Tian Y, Song J, An G, Yang P. mRNA Vaccines: The Dawn of a New Era of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2022; 13:887125. doi: 10.3389/fimmu.2022.887125.
24. Bidram M, Zhao Y, Shebardina NG, Baldin AV, Bazhin AV, Ganjalikhany MR, *et al.* mRNA-Based Cancer Vaccines: A Therapeutic Strategy for the Treatment of Melanoma Patients. *Vaccines (Basel).* 2021; 9(10):1060. doi: 10.3390/vaccines9101060.
25. Zhang X, Sharma PK, Peter Goedegebuure S,

Gillanders WE. Personalized cancer vaccines: Targeting the cancer mutanome. *Vaccine*. 2017; 35(7):1094-1100. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.05.073.

26. Morais P, Adachi H, Yu YT. The Critical Contribution of Pseudouridine to mRNA COVID-19 Vaccines. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9:789427. doi: 10.3389/fcell.2021.789427.

27. Lee J, Woodruff MC, Kim EH, Nam JH. Knife's edge: Balancing immunogenicity and reactogenicity in mRNA vaccines. *Exp Mol Med*. 2023; 55(7):1305-1313. doi: 10.1038/s12276-023-00999-x.

28. Kwon S, Kwon M, Im S, Lee K, Lee H. mRNA vaccines: the most recent clinical applications of synthetic mRNA. *Arch Pharm Res*. 2022; 45(4):245-262. doi: 10.1007/s12272-022-01381-7.

29. Kim SC, Sekhon SS, Shin WR, Ahn G, Cho BK, Ahn JY, *et al*. Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Mol Cell Toxicol*. 2022; 18(1):1-8. doi: 10.1007/s13273-021-00171-4.

30. Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, Foged C, Thakur A. Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-based Vaccines. *Pharmaceutics*. 2020; 12(2):102. doi: 10.3390/pharmaceutics12020102.

31. Jain S, Venkataraman A, Wechsler ME, Peppas NA. Messenger RNA-based vaccines: Past, present, and future directions in the context of the COVID-19 pandemic. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021; 179:114000. doi: 10.1016/j.addr.2021.114000.

32. Karim ME, Haque ST, Al-Busaidi H, Bakhtiar A, Tha KK, Holl MMB, *et al*. Scope and challenges of nanoparticle-based mRNA delivery in cancer treatment. *Arch Pharm Res*. 2022; 45(12):865-893. doi: 10.1007/s12272-022-01418-x.

33. Lorentzen CL, Haanen JB, Met Ö, Svane IM. Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncol*. 2022; 23(10):e450-e458. doi: 10.1016/S1470-2045(22)00372-2.

34. Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, *et al*. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RActive(®) vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2013; 9(10):2263-2276. doi: 10.4161/hv.25181.

35. Edwards DK, Jasny E, Yoon H, Horscroft N, Schanen B, Geter T, *et al*. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response. *J Transl Med*. 2017; 15(1):1. doi: 10.1186/s12967-016-1111-6.

36. Heine A, Juraneck S, Brossart P. Clinical and immunological effects of mRNA vaccines in malignant diseases. *Mol Cancer*. 2021; 20(1):52. doi: 10.1186/s12943-021-01339-1.

37. Zhang G, Tang T, Chen Y, Huang X, Liang T. mRNA vaccines in disease prevention and treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 2023; 8(1):365. doi: 10.1038/s41392-023-01579-1.

38. Vishweshwaraiah YL, Dokholyan NV. mRNA vaccines for cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2022; 13:1029069. doi: 10.3389/fimmu.2022.1029069.

39. Devaraja K, Aggarwal S, Singh M. Therapeutic Vaccination in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma-A Review. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(3):634. doi: 10.3390/vaccines11030634.

40. Li Y, Wang M, Peng X, Yang Y, Chen Q, Liu J, *et al*. mRNA vaccine in cancer therapy: Current advance and future outlook. *Clin Transl Med*. 2023; 13(8):e1384. doi: 10.1002/ctm2.1384.

41. Rojas LA, Sethna Z, Soares KC, Olcese C, Pang N, Patterson E, *et al*. Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature*. 2023; 618(7963):144-150. doi: 10.1038/s41586-023-06063-y.

42. Huff AL, Zaidi N. Vaccine boosts T cells that target pancreatic tumours. *Nature*. 2023; 618(7963):37-38. doi: 10.1038/d41586-023-01526-8.

43. Eljilany I, Castellano E, Tarhini AA. Adjuvant Therapy for High-Risk Melanoma: An In-Depth Examination of the State of the Field. *Cancers (Basel)*. 2023; 15(16):4125. doi: 10.3390/cancers15164125.

44. Clarke LA, Amaral MD. What Can RNA-Based Therapy Do for Monogenic Diseases? *Pharmaceutics*. 2023; 15(1):260. doi: 10.3390/pharmaceutics15010260.

45. Wein N, Alfano L, Flanigan KM. Genetics and emerging treatments for Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Pediatr Clin North Am*. 2015; 62(3):723-742. doi: 10.1016/j.pcl.2015.03.008.

46. Huang J, Zhou Y, Li J, Lu A, Liang C. CRISPR/Cas systems: Delivery and application in gene therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022; 10:942325. doi: 10.3389/fbioe.2022.942325.

47. Da Silva Sanchez A, Paunovska K, Cristian A, Dahlman JE. Treating Cystic Fibrosis with mRNA and CRISPR. *Hum Gene Ther*. 2020; 31(17-18):940-955. doi: 10.1089/hum.2020.137.