

## Protocolos de administración de quimioinmunoterapia en un sistema de leucemia linfocítica crónica

QFB. Luis Alberto Ramírez Islas<sup>a</sup>., Dra. Corina Plata Ante<sup>b</sup>, Dr. Luis Néstor Coria de los Ríos<sup>a</sup>, Dr. Paul Antonio Valle Trujillo<sup>a</sup>.,

<sup>a</sup> Tecnológico Nacional de México / IT Tijuana, Posgrado en Ciencias de la Ingeniería, Grupo de Investigación BioMath, Tijuana, Baja California, México. luis.ri@tectijuana.edu.mx, luis.coria@tectijuana.edu.mx, paul.valle@tectijuana.edu.mx

<sup>c</sup> Tecnológico Nacional de México / IT Tijuana, Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica, Tijuana, Baja California, México. corina.plata@tectijuana.edu.mx

### Resumen

En esta investigación, se busca investigar el efecto citotóxico de la aplicación combinada de clorambucilo y células CAR-T para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC). El objetivo de éste se alcanza mediante el modelado mecanicista y la intensiva experimentación in silico realizada sobre un modelo de tres ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden que fue formulado considerando una dinámica de saturación de Michaelis-Menten y la hipótesis de *log-kill* para la eliminación de las células de leucemia a través del tratamiento con quimioterapia e inmunoterapia, respectivamente. Además, la experimentación in silico ilustra resultados que se consideran consistentes con los hallazgos de investigaciones clínicas. Se proponen dos protocolos terapéuticos para eliminar las células B neoplásicas. Se distinguen entre sí por el uso de diferentes dosis de células CAR-T y el número de dosis utilizadas. En cuanto a la quimioterapia, la cantidad de clorambucilo utilizado no varía en dichas propuestas. Por lo tanto, se espera que la metodología sea útil como base para desarrollar regímenes terapéuticos personalizados para el tratamiento de la CLL.

**Palabras clave**—quimioterapia, inmunoterapia, in silico, leucemia, modelado matemático, ODEs

### Abstract

In this paper we aim to investigate the cytotoxic effect of the combined application of chlorambucil and CAR-T cells for the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL). The latter is achieved by mechanistic modelling, and extensive in silico experimentation on a set of three first-order ordinary differential equations that were formulated by considering the Michaelis-Menten saturation dynamics and the *log-kill* hypothesis for the leukemia cells eliminated by the chemotherapy and the immunotherapy treatments, respectively. Further, the in-silico experimentation illustrates results that are considered to be consistent with the findings of clinical investigations. Two therapeutic protocols are proposed in order to eliminate neoplastic B cells. They are distinguished themselves by using different CAR-T cell doses and the number of doses used. Regarding chemotherapy, the amount of chlorambucil used does not vary in the proposals

made. Hence, we expect our methodology to be helpful in developing personalized therapeutic regimens for CLL treatment.

**Keywords**—Chemotherapy, immunotherapy, in silico, leukemia, mathematical model, ODEs.

### 1. INTRODUCCIÓN

En México, se reporta que las neoplasias malignas se encuentran en la cuarta posición entre las principales causas de muerte en el país. Las leucemias son la primera y tercera formas de cáncer presentes en los grupos de hombres y mujeres de cero a 29 años y de 30 a 59 años, respectivamente [1,2]. Además, la tasa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos oscila entre las 21 y 98 defunciones por cada cien mil habitantes en hombres. Mientras que, en el caso de las mujeres, ronda entre las 19 y 69 defunciones por cada cien mil habitantes [3].

En particular, la leucemia linfocítica crónica (LLC), identificada en la sección 2A82.0 de la CIE-12, se caracteriza por presentarse en adultos mayores de 65 años. Además de una incidencia de 2:1 en hombres a mujeres [4,5]. A nivel celular, se trata de una proliferación descontrolada de linfocitos B, cuyo fenotipo diferencial es CD19<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> y CD5<sup>bajo</sup>, así como algunas inmunoglobulinas atípicas. Presenta una supervivencia cercana al 50% con el tratamiento correcto. Sin embargo, existe una amplia variedad de tratamientos que incluyen, pero no se limitan, a: quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida [5,6]. Las opciones terapéuticas se aplican en forma de monoterapia o politerapia. En los últimos años se ha popularizado la quimioinmunoterapia, la cual consiste en la coadministración de agentes quimioterapéuticos con alguna de las variantes de inmunoterapia [7]. Los medicamentos antineoplásicos usados con mayor frecuencia son fludarabina, ciclofosfamida y clorambucilo en diferentes estrategias como tratamiento [8]. En cuanto a las opciones de inmunoterapia se incluye la administración de interleucinas, anticuerpos y células inmunitarias. La administración de células CAR-T se ha posicionado en primer mundo como una novedosa opción de inmunoterapia medida por células inmunitarias forma parte de las opciones con mayor viabilidad contra la LLC [9].

Desde el siglo pasado, se ha trabajado con el desarrollo de modelos matemáticos que permitían, en un principio, describir el comportamiento de las células neoplásicas. Con el paso del tiempo, los modelos han ampliado sus posibilidades, de tal forma que pueden describir el comportamiento de las poblaciones tumorales, así como su respuesta a estímulos endógenos y exógenos, tales como tratamientos [10-12]. Asimismo, se han especializado de tal forma que modelizan el comportamiento según el tipo de cáncer. Por lo que, los modelos están planteados a partir de las variaciones biológicas y particularidades de las diferentes neoplasias [13].

Dentro de la literatura científica, se puede encontrar precedentes del desarrollo de protocolos terapéuticos con un

abordar basado en la experimentación *in silico*. En [14] se proponen diferentes regímenes de administración de células CAR-T para la leucemia linfocítica aguda (LLA) considerando diferentes dosis y carga tumoral. En [15] se aborda el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) con inmunoterapia de tipo celular a partir de un modelo de ecuaciones diferenciales previamente descrito en la literatura. Además, se han diseñado otros abordajes terapéuticos con contra la LLC con un sistema de cuatro ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden, en el cual se definen diferentes periodicidades y dosis de quimioinmunoterapia [16].

En este trabajo se presenta una aproximación para un par de protocolos de administración de un tratamiento quimioinmunoterapéutico contra la leucemia linfocítica crónica desarrollado a través de la experimentación *in silico* basados en las consideraciones clínicas mencionadas por la literatura médica. Se propone utilizar inmunoterapia mediada por células CART-19 y clorambucilo como agente quimioterapéutico, ya que ambos tienen una predilección molecular contra los linfocitos B característicos de esta leucemia [10, 17-19].

## 2. MODELO MATEMÁTICO DE LA LLC Y QUIMIOINMUNOTERAPIA

Se plantea un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden, el cual se presenta por el modelo (1) – (3). La población de linfocitos B neoplásicos se representa por la Ecuación (1), la población de células CART-19 se representa por la Ecuación (2) y la Ecuación (3) se encarga de describir la concentración de clorambucilo. La eliminación de las células neoplásicas se basa en la teoría de *log-kill* y la hipótesis  $E_{max}$  o de saturación, mediada por el clorambucilo y las células CART-19, respectivamente [20]. La Tabla 1 muestra los valores de los parámetros del sistema. La Tabla 2 resume el significado de los parámetros del sistema.

$$\dot{x} = \kappa_1 x \left(1 - \frac{x}{\kappa_2}\right) - \kappa_3 xy - \frac{\kappa_4 xz}{\kappa_5 + z} \quad (1)$$

$$\dot{y} = \psi - \psi_1 y + \frac{\psi_2 xy}{\psi_3 + x} - \psi_4 xy - \frac{\psi_5 yz}{\psi_6 + z} \quad (2)$$

$$\dot{z} = \varepsilon - \varepsilon_1 z \quad (3)$$

Tabla 1. Parámetros empleados en el sistema.

| Parámetro  | Valor                 | Unidades                             |
|------------|-----------------------|--------------------------------------|
| $\kappa_1$ | 1.68                  | 1/días                               |
| $\kappa_2$ | $4.64 \times 10^{11}$ | células                              |
| $\kappa_3$ | $3.41 \times 10^{-9}$ | (células $\times$ día) <sup>-1</sup> |
| $\kappa_4$ | 0.432                 | 1/día                                |
| $\kappa_5$ | $2.0 \times 10^3$     | mg                                   |
| $\psi_1$   | $2.0 \times 10^{-2}$  | 1/días                               |
| $\psi_2$   | $3.0 \times 10^{-11}$ | 1/días                               |
| $\psi_3$   | 4.494                 | células                              |
| $\psi_4$   | $2.0 \times 10^{-14}$ | (células $\times$ día) <sup>-1</sup> |
| $\psi_5$   | 0.0486                | 1/días                               |
| $\psi_6$   | $2.0 \times 10^3$     | mg                                   |

|                 |       |       |
|-----------------|-------|-------|
| $\varepsilon_1$ | 11.09 | 1/día |
|-----------------|-------|-------|

Fuente: [15,16, 21-23]

Tabla 2. Descripción de los parámetros del sistema.

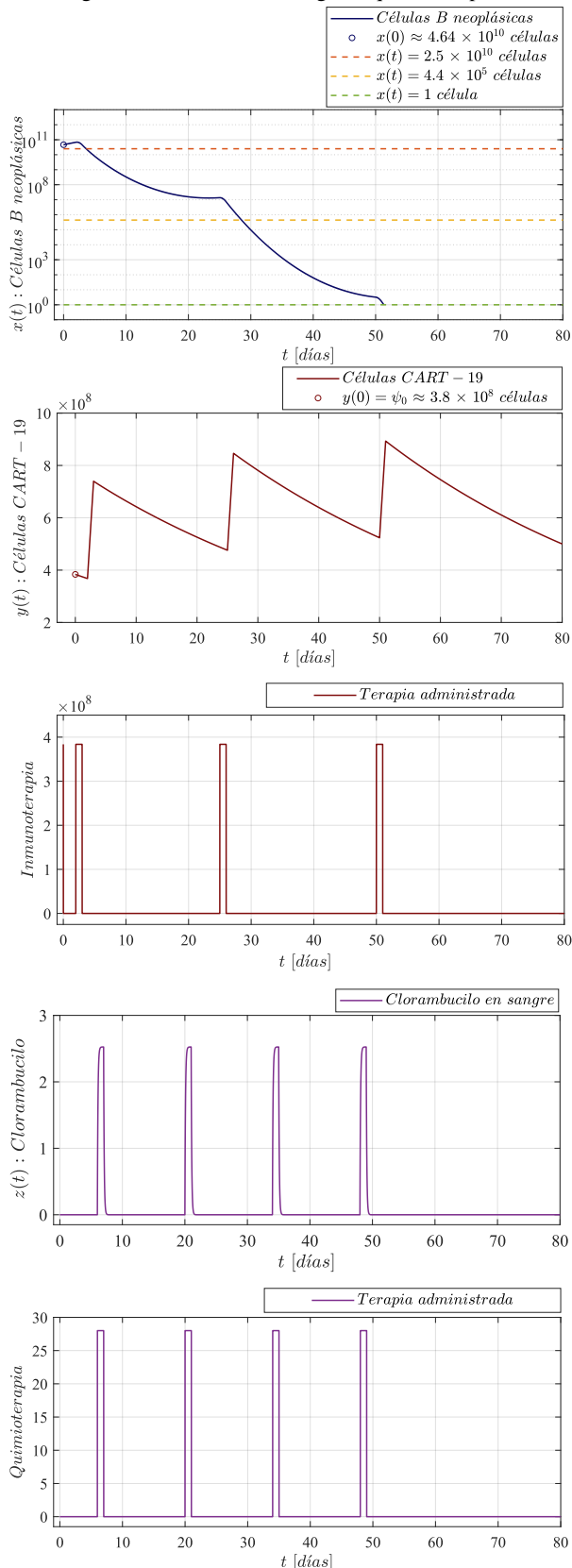
| Parámetro       | Descripción   |
|-----------------|---|
| $\kappa_1$      | Tasa de crecimiento de los linfocitos B neoplásicos                                   |
| $\kappa_2$      | Capacidad de carga máxima   |
| $\kappa_3$      | Tasa de eliminación de los linfocitos B neoplásicos con las células CAR-T             |
| $\kappa_4$      | Citotoxicidad del clorambucilo hacia los linfocitos B neoplásicos                     |
| $\kappa_5$      | Cantidad de clorambucilo  |
| $\psi_1$        | Tasa de muerte natural de las células CAR-T   |
| $\psi_2$        | Tasa máxima de activación de las células CAR-T por los linfocitos B neoplásicos       |
| $\psi_3$        | Parámetro de saturación media   |
| $\psi_4$        | Tasa de inactivación de las células CAR-T por los linfocitos B neoplásicos            |
| $\psi_5$        | Citotoxicidad del clorambucilo hacia las células CAR-T                                |
| $\psi_6$        | Cantidad de clorambucilo que produce el 50% del máximo efecto sobre las células CAR-T |
| $\varepsilon_1$ | Vida media del clorambucilo   |

Fuente: [15,16, 21-23]

## 3. EXPERIMENTACIÓN *IN SILICO*: PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO

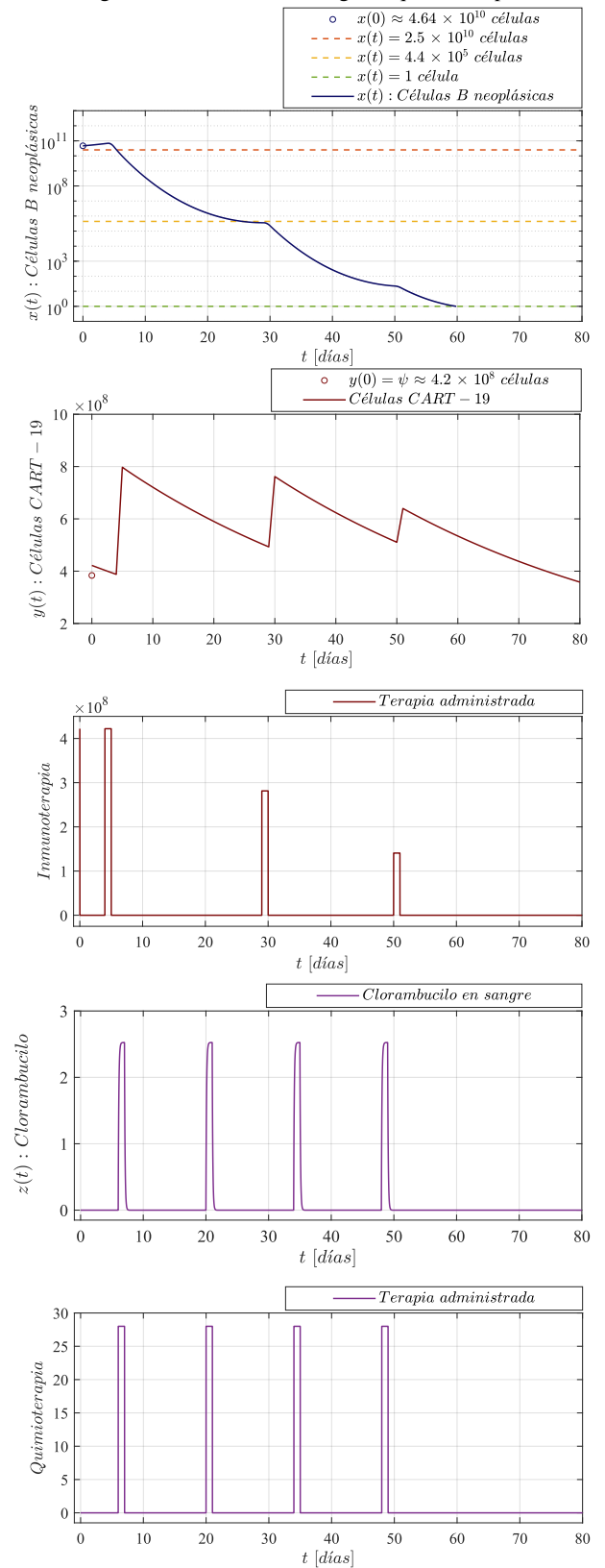
Se presentan dos estrategias de tratamiento por quimioinmunoterapia. En la Fig. 1 se presenta la progresión de la población de linfocitos B neoplásicos con cuatro dosis de  $3.8 \times 10^8$  de células CART-19 junto a la administración de cuatro dosis de 28 mg de clorambucilo como agente quimioterapéutico. Después, se muestra el comportamiento de las células CART-19 al enfrentarse a los linfocitos B neoplásicos. En el caso de la tercera serie de tiempo, se muestra que la inmunoterapia se administra en los días 0, 2, 25 y 50. La concentración de clorambucilo en sangre a través de los días se presenta en la cuarta serie de tiempo. Mientras que, en la quinta serie de tiempo, se observa que la administración del fármaco se realiza los días 6, 20, 34 y 48. De manera global, en la primera serie de tiempo, se observa que después de la segunda administración de las células CART-19, se presenta una disminución sostenida hasta el día 20. Tras la tercera administración de las células CART-19, se observa una disminución sostenida de los linfocitos B neoplásicos. El umbral de  $4.4 \times 10^5$  células, que representa el límite detectable de linfocitos B neoplásicos en pacientes, se rebasa alrededor del día 28. El umbral de una célula se rebasa alrededor del día 51, por lo que es el punto donde se ha logrado la eliminación total de la población de linfocitos B neoplásicos [25-27].

Fig. 1. Propuesta de protocolo de administración con cuatro dosis de  $3.8 \times 10^8$  de células CART-19 junto a la administración de cuatro dosis de 28 mg de clorambucilo como agente quimioterapéutico.



Fuente: Elaboración propia.

Fig. 2. Propuesta de protocolo de administración con tres dosis de  $4.2 \times 10^8$  de células CART-19 junto a la administración de cuatro dosis de 28 mg de clorambucilo como agente quimioterapéutico.



Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, en la Fig. 2 se presenta la progresión de la población de linfocitos B neoplásicos con la administración de tres dosis de  $4.2 \times 10^8$  de células CART-19 junto a la administración de cuatro dosis de 28 mg de clorambucilo como agente quimioterapéutico. En la segunda serie de tiempo, se muestra el comportamiento de las células CART-19 al enfrentarse a los linfocitos B neoplásicos. En el caso de la tercera serie de tiempo, se muestra que la propuesta consiste en administrar la inmunoterapia los días 0 y 4 con dosis completas de  $4.2 \times 10^8$  de células CART-19 cada una. Para la tercera dosis, se propone fraccionarla en dos tercios para el día 29 y el tercio restante, en el día 50. La concentración de clorambucilo en sangre a través de los días se presenta en la cuarta gráfica. Mientras que, en la quinta serie de tiempo, se observa que la administración del fármaco se realiza en los días 4, 20, 32 y 48. Se observa en la primera gráfica, después de aplicar la segunda dosis de inmunoterapia, una disminución sostenida de linfocitos B neoplásicos. Alrededor del día 25 se alcanza el umbral de  $4.4 \times 10^5$  células, que representa el límite detectable de linfocitos B neoplásicos en pacientes. Gracias a la aplicación de la última dosis fraccionada en los días 29 y 50, se pasa el umbral de una célula en el día 60, lo cual indica eliminación de la población de linfocitos B neoplásicos [25-27].

En algunos artículos, como parte de la práctica clínica, se evalúa la presencia de linfocitos B neoplásicos a fin de determinar la prognosis de la enfermedad en el día 28 [24]. En la Fig. 1, en la primera serie de tiempo, el límite de  $2.5 \times 10^{10}$  células se refiere a la cantidad absoluta de linfocitos B presentes en 5 litros de tejido sanguíneo. En cuanto al límite de  $4.4 \times 10^5$  células resulta de una extrapolación del límite de detección de los citómetros de flujo [25-27]. Por lo tanto, en ambos protocolos, alrededor del día 30 se logra rebasar el límite de detección de los linfocitos B. Las cuarta y quinta series de tiempo de las Fig. 1 y Fig. 2 muestran tanto la concentración y la administración de clorambucilo medido en miligramos por litro de sangre y miligramos, respectivamente.

#### 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Desde 1955, el clorambucilo ha sido parte de diversos tratamientos antineoplásicos, en especial contra la LLC. Se caracteriza por ser un fármaco de primera línea por ser lo suficientemente seguro para su uso contra los linfocitos B en estado anormal de proliferación [28]. La vida media del clorambucilo es corta, por lo que, tras 2 horas de su administración, alcanza la concentración media plasmática [29]. El mecanismo de acción del clorambucilo es a través de la inducción de entrecruzamientos en las cadenas de ADN de tal manera que las células no neoplásicas también se pueden ser blanco del efecto citotóxico. Un segundo punto por tomar en cuenta que el efecto farmacológico deseado es independiente al tiempo que pasa el fármaco en sangre [30]. La finalidad de la quimioinmunoterapia es aumentar la respuesta antitumoral y la supervivencia de los pacientes [17]. Debido a la naturaleza química del receptor de células CAR-T, es posible elegir diferentes marcadores moleculares

de superficie según las células de blanco de interés. De esta forma, se logra la eliminación de las células neoplásicas de manera directa por mecanismos citotóxicos mediados por inmunidad celular [18,19]. Para la LLC, se ha planteado que el CD19 por ser el marcador molecular que mayormente se expresa en los linfocitos B neoplásicos [31,32]. La especificidad celular es alta, sin embargo, se ha reportado la existencia de efectos adversos considerados leves y moderados sin llegar a la fatalidad [24,33,34]. Se han publicado estudios clínicos enfocados al tratamiento de la LLC con células CAR-T con el uso de una a tres infusiones de dosis, las cuáles se pueden administrar en su totalidad o en fracciones de dosis. Se ha documentado la administración de un total de  $5.0 \times 10^8$  células CAR-T19 como dosis máxima distribuidas hasta en tres dosis con pronósticos clínicos variables. Al comparar los protocolos propuestos, es evidente el empleo de una mayor cantidad de células, sin embargo, en ambos casos representan entre 2 y 3 veces la dosis usada en ensayos clínicos, por lo que su aplicación a nivel biológico podría ser viable. Además, en el segundo protocolo se plantea el uso de una tercera dosis fraccionada, lo cual ha sido descrito en algunos estudios y es totalmente viable debido a la criopreservación de las células [24,32,34,35].

#### 5. CONCLUSIONES

Las simulaciones obtenidas poseen un comportamiento similar al que tiene los pacientes durante la remisión de la enfermedad. Sin embargo, la cantidad de dosis administrada representa un aumento en la cantidad absoluta de células CAR-T reportado hasta el momento en la literatura clínica. Para poder tener una visión completa del fenómeno es importante la comparación y aproximación de la carga tumoral y el régimen terapéutico con datos experimentales. Así como la aplicación de un análisis matemático que de un mayor sustento a las aseveraciones realizadas.

#### 6. AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece a CONACyT por la beca 801729 otorgada para realizar los estudios de posgrado. Este trabajo fue apoyado por el Proyecto TecNM 'Gemelos digitales para el análisis y control de sistemas biológicos'.

#### 4. REFERENCIAS

- [1] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (4 de febrero de 2021). INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero): [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP\\_CANCER22.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_CANCER22.pdf)
- [2] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2 de febrero de 2022). INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos nacionales: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP\\_CANCER22.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_CANCER22.pdf)
- [3] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (27 de Julio de 2022). INEGI. Estadísticas de defunciones registradas 2021 (preliminar):

- [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021\\_07.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021_07.pdf)
- [4] World Health Organization. (Febrero de 2022). International Classification of Diseases 11th Revision. 2A82.0 Leucemia linfocítica crónica o linfoma de linfocitos pequeños: <https://icd.who.int/browse11/l-m/es#/http%3a%2f%2fid.who.int%2ficd%2fentity%2f1239211846>
- [5] Faderl, S., y Kantarjian, H. (2021). Leukemias: Principles and practice of therapy. Blackwell Publishing Ltd.
- [6] Coleman, M. (2019). Understanding CLL/SLL Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. A guide for patients, survivors and loved ones. Lymphoma Research Foundation.
- [7] Smolej, L., Vodárek, P., Écsiová, D., & Šimkovič, M. (2021). Chemoimmunotherapy in the First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: Dead Yet, or Alive and Kicking?. *Cancers*, 13(13), 3134.
- [8] Bewarder, M., Stilgenbauer, S., Thurner, L., & Kaddu-Mulindwa, D. (2021). Current Treatment Options in CLL. *Cancers*, 13(10), 2468.
- [9] Patel, K., Pagel, J.M. Current and future treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol* 14, 69 (2021).
- [10] Wodarz, D., & Komarova, N. L. (2014). Dynamics of cancer. *Mathematical foundations of oncology*. World Scientific.
- Marusic, M. (1996). Mathematical models of tumor growth. *Mathematical colloquium*, 1, 175-192.
- [11] Chuang, S., & Lloyd, H. H. (1975). Mathematical analysis of cancer chemotherapy. *Bulletin of mathematical biology*, 37(1), 147-160.
- [12] Martin, R. B., Fisher, M. E., Minchin, R. F., & Teo, K. L. (1990). A mathematical model of cancer chemotherapy with an optimal selection of parameters. *Mathematical biosciences*, 99(2), 205-230.
- [13] Eisen, M. (1979). *Mathematical models in cell biology and cancer chemotherapy*. Springer.
- [14] Valle, P.A.; Coria, L.N.; Plata, C.; Salazar, Y. CAR-T Cell Therapy for the Treatment of ALL: Eradication Conditions and In Silico Experimentation. *Hemato* 2021, 2, 441–462
- [15] Valle, P.A.; Coria, L.N.; Plata, C. Personalized Immunotherapy Treatment Strategies for a Dynamical System of Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancers* 2021, 13, 2030.
- [16] Valle, P.A.; Garrido, R.; Salazar, Y.; Coria, L.N.; Plata, C. Chemoimmunotherapy Administration Protocol Design for the Treatment of Leukemia through Mathematical Modeling and In Silico Experimentation. *Pharmaceutics* 2022, 14, 1396.
- [17] Jaglowski, S., & Jones, J. A. (2010). Choosing first line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*, 11(9), 1379-1390.
- [18] Abbas, A. K., Litchman, A. H., & Mai, S. P. (2018). Cellular and molecular immunology. Elsevier.
- [19] Graham, A., Hewitson, R., Pagliuca, A., & Benjamin, R. (2018). Cancer immunotherapy with CAR-T cells – behold the future. *Clinical Medicine*, 18(4), 324-328. Todorovic, Z., Todorovic, D., Markovic, V., Ladjevac, N., Zdravkovic, N., Djurdjevic, P., Arsenijevic, N., Milovanovic, M., Arsenijevic, A., & Milovanovic, J. (2022). CAR T Cell Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: Successes and Shortcomings. *Current oncology* (Toronto, Ont.), 29(5), 3647–3657.
- [20] Moradi, H., Vossoughi, G., & Salarieh, H. (2013). Optimal robust control of drug delivery in cancer chemotherapy: a comparison between three control approaches. *Computer methods and programs in biomedicine*, 112(1), 69–83.
- [21] Rodrigues, D. S., Mancera, P. A., Carvalho, T., & Gonçalves, L. F. (2019). A mathematical model for chemoimmunotherapy of chronic lymphocytic leukemia. *Applied Mathematics and Computation*, 349, 118-133.
- [22] Guzev, E., Luboshits, G., Bunimovich-Mendrazitsky, S., & Firer, M. A. (2021). Experimental validation of a mathematical model to describe the drug cytotoxicity of leukemic cells. *Symmetry*, 13(1760).
- [23] de Pillis, L., Fister, R., Gu, W., Collins, C., Daub, M., Gross, D., Moore, J., Preskill, B. (2009). Mathematical model creation for cancer chemo-immunotherapy. *Computational and mathematical methods in medicine*, 10(3), 165-184.
- [24] Frey, N. V., Gill, S., Hexner, E. O., Schuster, S., Nasta, S., Loren, A., Svoboda, J., Stadtmayer, E., Landsburg, D. J., Mato, A., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Veloso, E., Gaymon, A., Pequignot, E., Shan, X., Hwang, W. T., June, C. H., & Porter, D. L. (2020). Long-Term Outcomes From a Randomized Dose Optimization Study of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(25), 2862–2871.
- [25] Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Niemann, C. U., Kater, A. P., Gregor, M., Cymbalista, F., Buske, C., Hillmen, P., Hallek, M., Mey, U. (2021). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 32(1), 23–33.
- [26] Nursing Critical Care. (2019). Lymphocyte count. *Nursing Critical Care*, 14(6), 36-37.
- [27] Rawstron, A. C., Fazi, C., Agathangelidis, A., Villamor, N., Letestu, R., Nomdedeu, J., Palacio, C., Stehlikova, O., Kreuzer, K. A., Liptrot, S., O'Brien, D., de Tute, R. M., Marinov, I., Hauwel, M., Spacek, M., Dobber, J., Kater, A. P., Gambell, P., Soosapilla, A., Lozanski, G., ... Ghia, P. (2016). A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*, 30(4), 929–936.
- [28] Kaung, D. T., Whittington, R. M., & Patno, M. E. (1964). Chemotherapy of chronic lymphocytic leukemia. *Archives of internal medicine*, 11(2), 521-524.
- [29] Silvennoinen, R., Malmiemi, K., Malmiemi, O., Seppala, E., & Vilpo, J. (2000). Pharmacokinetics of Chlorambucil in Patients with Chronic Lymphocytic

Leukaemia: Comparison of Different Days, Cycles and Doses. *Pharmacology and toxicology*, 87, 223-228.

[30] Begleiter, A., Mowat, M., Israels, L. G., & Johnston, J. B. (1996). Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leukemia and lymphoma*, 23, 187-201.

[31] Todorovic, Z., Todorovic, D., Markovic, V., Ladjevac, N., Zdravkovic, N., Djurdjevic, P., Arsenijevic, N., Milovanovic, M., Arsenijevic, A., & Milovanovic, J. (2022). CAR T Cell Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: Successes and Shortcomings. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 29(5), 3647–3657.

[32] Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cell in chronic lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 365, 725-733.

[33] Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal*, 69, 11.

[34] Geyer, M. B., Rivière, I., Sénéchal, B., Wang, X., Wang, Y., Purdon, T. J., Hsu, M., Devlin, S. M., Halton, E., Lamanna, N., Rademaker, J., Sadelain, M., Brentjens, R. J., & Park, J. H. (2018). Autologous CD19-Targeted CAR T Cells in Patients with Residual CLL following Initial Purine Analog-Based Therapy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(8), 1896–1905.

[35] Li, R., Johnson, R., Yu, G., McKenna, D. H., & Hubel, A. (2019). Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials. *Cryotherapy*, 21(9), 943-957