

MEZŐ GÁBOR–KISS KRISZTINA–BIRI-KOVÁCS BEÁTA–OLÁHNÉ SZABÓ RITA

# Személyre szabott rákgyógyítás

A daganatos megbetegedések okozta halálozások száma Magyarországon a korábbi növekvő tendencia után 2013 óta stagnál, valamivel kevesebb, mint 32800 eset/év. Ez akár jónak is mondható, ha azt vesszük figyelembe, hogy a megbetegedések száma közben növekszik. A gyógyulásra való esély növekedésének okai az egyre jobb diagnosztikai és terápiás lehetőségek. Azonban elégedettségre nem lehetünk, mert még mindig nálunk figyelhető meg az egyik legrosszabb statisztika ezen a területen Európában. Ezért nagyon fontos, hogy a tumorterápiával kapcsolatos kutatások megkülönböztetett figyelmet és támogatást kapjanak Magyarországon is. Különösen a magas mortalitású tumorok esetén lenne szükség nagy áttörést hozó új eredményekre. Ezen daganatos megbetegedések közé tartoznak a tüdő- és légzőszervi tumorok, a vastagbél és az emésztőrendszer rosszindulatú daganatai, az emlő- és hasnyálmirigy-tumorok. Az emlőtumorok, ha időben diagnosztizálják azokat, elég jól gyógyíthatóak, és az esetek több mint kétharmadában teljes gyógyulás vagy 5 évnél hosszabb túlélés érhető el. Ebben az esetben a nagy esetszám miatt jelentős a halálozások száma. A másik végtel a hasnyálmirigy rosszindulatú daganata, amely ugyan kis esetszámban fordul elő, de a legpusztítóbb rákfajta, csupán az esetek 5%-ában lehet öt évnél hosszabb túlélést elérni.

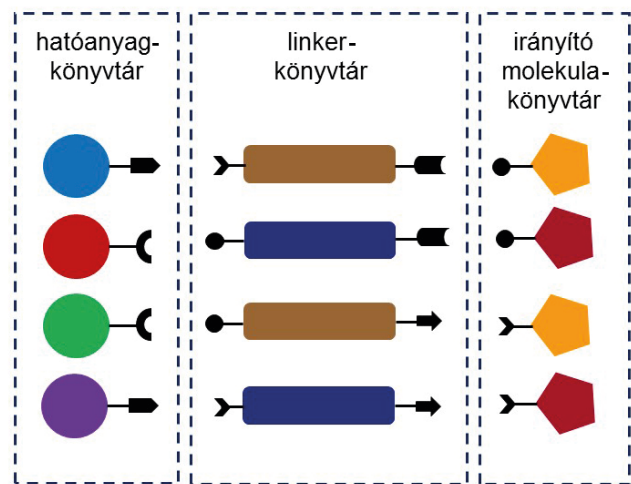
Kutatócsoportunk arra vállalkozott, hogy három olyan vegyülettárat állít elő (1. tumorelleses hatóanyagok; 2. irányító molekulák; 3. az előző kettőt összekapcsoló bifunkciós linkerek), amelyek nagy variabilitással kapcsolhatók egymáshoz, így akár 100 különböző gyógyszerjelölt molekulát is könnyen elő lehet állítani. Ezek a gyógyszerjelöltek alkalmasak lehetnek a magas mortalitású tumorok hatékony, személyre szabott, célzott terápiájára.

Mit takar a személyre szabott célzott tumorterápia? A módszer, amelyet célzott vagy irányított daganatterápiának neveznek, azon alapszik, hogy olyan anyagokkal támadják a ráksejteket, amelyek nagy szelektivitással ismerik fel a beteg sejteket. Ezzel az eljárással az egészséges szövetek megkímélhetők, csökkentve a terápia káros mellékhatásait és javítva a

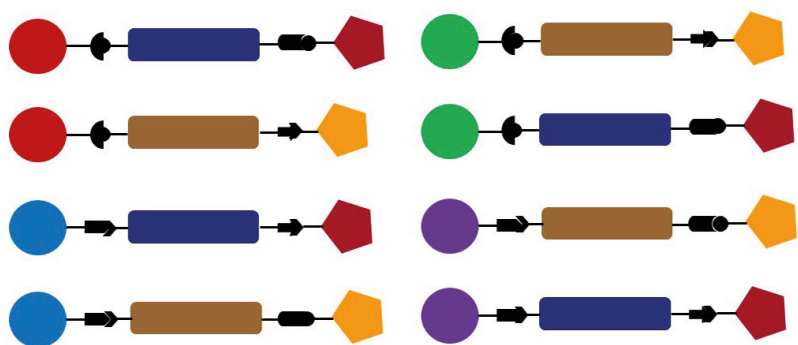
paciens életminőségét a kezelés alatt. Ez nagy előrelépés lenne a jelenleg alkalmazott kemoterápiás eljárásokhoz képest, ahol a gyógyszermolekulák bejuthatnak nemcsak a ráksejtekbe, hanem az egészséges sejtekbe is, amelyekre szintén toxikus hatásúak. Természetesen ahhoz, hogy ezt a terápiát hatékonyan lehessen alkalmazni, ismerni kell az adott daganaton

lyozni, hogy egy szervtípus (pl. tüdő, hasnyálmirigy) rákos megbetegedésekor sem biztos, hogy azonos tumorról beszélünk. A különböző tumortípusok esetén pedig más-más gyógyszerre lehet szükség. Leegyszerűsítve, két különböző hasnyálmirigy-tumor-sejt (pl. Panc-1 és MiaPaca2) más-más receptorkészlettel rendelkezik, tehát más-más irányító molekulák lesz-

nek alkalmasak arra, hogy a kiválasztott és az adott sejten hatóanyagot, amelyek szintén lehetnek különbözőek, célba juttassa. Ahogy azt a 2011-ben megjelent cikkünkben bemutatottuk, a sejtfelszíni receptorokon keresztül történő gyógyszer célba juttatásának hatékonyságát korlátozhatja az, hogy a ráksejteken a receptorok száma limitált.



Hatóanyag – irányító molekula-konjugátumok



1. ábra. A három vegyülettár (hatóanyag, linker, irányító molekula) és a belőlük felépíthető konjugátumok vázlatos képe. A komponensek számának növelésével a variációs lehetőségek száma jelentős mértékben nő

azokat a molekulákat (pl. receptorokat), amelyek támadhatók a rák elpusztításának reményében. Ezeket a molekulákat a daganat eltávolítása, vagy biopsziás szövettani mintavétel után speciális vizsgálatokkal határozzák meg. Azt is érdemes hangsú-

Ezért a vegyület koncentrációjának növekedése nem feltétlenül vezet a hatékonyság növekedéséhez. Megoldás lehet, ha a daganatellenes szerket különböző irányító molekulákhoz kapcsoljuk, amelyek eltérő receptorokat ismernek fel a ráksejteken.

Az így előállított vegyületek kombinációban történő alkalmazásával – a kapcsolt hatóanyagoktól függően – a komponensek hatása összeadódhat (additív hatás) vagy még erősíthetik is egymás hatását (szinergista hatás) a daganat elpusztításában. Ez az eljárás is azt feltételezi, hogy sokféle hatóanyag irányító molekula kombinációjára lehet szükség. Reményeink szerint az előállítandó vegyületkönyvtárak alkalmasak lesznek arra is, hogy ne csak különböző ráktípusokra fejlesszünk ki hatóanyagot irányító molekula-konjugátumokat, hanem egy azon daganattípusra több hatékony vegyületet is készíthessünk az adott elemekből (1. ábra).

Eddig főleg a rák elpusztítására alkalmas hatóanyagról, illetve az azt célba juttatni képes, a daganatsejteken lévő receptorokat felismerő, és azokhoz kötődni képes irányító molekuláról volt szó. Nagyon fontos szerepe van azonban a linker komponens összekötő bifunkciós linkernek, az összekötő elemnek is. Ennek biztosítania kell, hogy a kialakított konjugátum stabil maradjon addig, amíg a vegyület eljut a célzott ráksejtekhez, de bejutva a sejtekbe, a hatóanyag vagy annak aktív metabolitja fel tudjon szabadulni a konjugátumból. Ez szükséges általában ahhoz, hogy a gyógyszer kifejthesse tumort pusztító hatását. Mindehhez az szükséges, hogy mind a hatóanyag, mind az irányító molekulán legyen olyan, lehetőleg egymástól eltérő típusú funkciós csoport, amelyik a linker két funkciós csoportjához külön-külön és szelektíven, kovalens kémiai kötés kialakítása során kapcsolódni tud. A különböző komponensek közötti kapcsolatról azt érdemes megemlíteni, hogy míg az irányító molekula és a linker közötti kötésnek nem kell bomlania, így akár egy nagyon stabil kötés (pl. tioéter-kötés) is lehet, addig a linker és a hatóanyag közötti kötést célszerű úgy kialakítani, hogy a szabad hatóanyag vagy annak aktív metabolitja felszabaduljon a ráksejtekben.

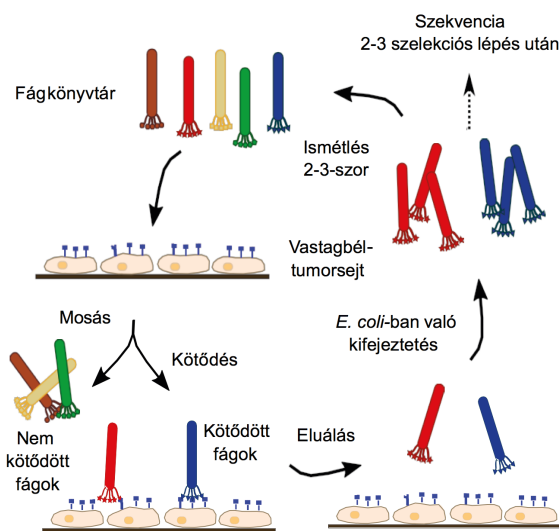
Bár, mint azt látjuk, a konjugátum mindhárom komponense igen fontos szerepet tölt be a hatóanyag célba juttatásában, és így nem érdemes a hatás szempontjából kiemelni egyiket sem, talán mégis egy kicsit megkülönböztetett jelentősége van az irányító molekulának, hisz ez az egység fogja eredményezni a konjugátum tumor-specifikusságát, ami kezelés során a gyógyszer mellékhatásainak csökkenését okozza. Ahogy említettük, ezek az irányító molekulák a ráksejteken a szelektíven vagy nagy mennyiségben előforduló receptorokat ismerik fel. Ezen receptorok és a hozzájuk kötődni képes ligandumok (pl. peptid hormonok) közül már sok ismert és folynak is kutatások velük a célzott tumorterápia területén. Korábban e

folyóirat hasábjain már bemutattuk az ezen a területen a gonadotropin-releasing hormon (GnRH) analógjainak felhasználásával elért eredményeinket. Azonban érdemes újabb irányító molekulákat is keresni, amelyek vagy más ráksejtek ismernek fel, vagy ugyanazon daganatsejtek más receptorait, és így alkalmasak lehetnek a kombinált célzott terápiára. Az utóbbi időben egyre elterjedtebben használják ilyen célpontok és ligandumaik feltérképezésére az irányított evolúció egyik fajtáját, az úgynevezett fágbemutató technikát. Ennek a módszernek a nagyon leegyszerűsített vázlatát mutatja a 2. ábra.

A bakteriofágok olyan vírusok, melyek baktériumokat támadnak meg. Szerkezetük igen egyszerű, egy külső fehérjeburokból és a benne található örökítő anyagból épülnek fel. Az eljárás lényege, hogy a vizsgálni kívánt peptidszekvenciákat kódoló gént a peptid kifejezésére használt

meg (ennyiféle heptapeptid állítható elő a 20 aminosav kombinációjából). Azonban a kiválasztást úgy tervezik, hogy minden fágtypusból több, általában 100–1000 leegyen kiinduláskor. Ezt a  $10^{11}$  klónt tartalmazó keveréket hozzák össze a vizsgálni kívánt típusú tumorsejtekkel. Azok a klónok, amelyek olyan peptidszekvenciát tartalmaznak, amiket a ráksejteken lévő receptorok felismernek, azok (különböző erősséggel) kötődnek a sejtekhez, amelyek viszont nem kötődnek, azt lemosás a sejtekről. Ezután a kötődött klónokat leválasztják a sejtekről, ezeket felszaporítják baktériumsejtekben, majd egy új ciklusban újra összehozzák a sejtekkel. Ezt a kikötési és lemosási ciklust 3–5-ször megismétlik, így a jól kötődő peptidet tartalmazó klónok feldúsulnak a keverékben. Minél több ciklust végeznek, annál nagyobb valószínűséggel vannak jelen a jól kötődő tumorszelektív fágok a keverékben.

Ezután a megmaradt fágokból random módon kiválasztanak kb. 50 klónt, és megfelelő módszerekkel (a fágban található örökítő anyagot szekvenálva) meghatározzák a nukleinsav-szekvenciát, amiből következtetni tudnak az aminosav-szekvenciára, jelen esetben a heptapeptid szekvenciájára, amely felismeri az adott típusú ráksejtet. Azonban a 3–5. szelektációs lépés után is több száz, esetleg több ezer különböző peptidet tartalmazó klón keveréke van jelen (a szelektációs lépések számának növekedésével ez a szám csökken). Az összes klónt természetesen nagyon időigényes és drága lenne végigvizsgálni. Ezért választanak ki li-



2. ábra. A peptidszekvenciák kiválasztására alkalmas fágbemutató eljárás sematikus bemutatása

bakteriofág génjéhez illesztik, így ez a peptidszakasz kifejeződik a bakteriofág burokkéregjében. Minden egyes fág egy peptidet fog kifejezni, és a fágban található örökítő anyag tartalmazni fogja az adott peptidet kódoló nukleinsavat. A felszínükön különböző peptideket megjelenítő fágok közül szelektációs eljárással lehet a legmegfelelőbbeket kiválasztani, ami általában kötődési teszten alapul. A fágok felszaporítása olyan baktériumtörzsekben történik, amiket a fág képes fertőzni. Ha egy hét aminosavból álló peptidet (heptapeptid) akarunk vizsgálni, figyelembe véve, hogy a 20 természetes fehérjeépítő aminosavat akarjuk beépíteni minden pozícióba, akkor  $7^{20}$  klónnal kell számolnunk, ami kb.  $10^9$  klónnal felel

mitált számú (pl. 50) klónt a vizsgálatához. Ebből persze az következik, hogy lehet, hogy vannak a keverékben olyan peptideket tartalmazó klónok, amelyek még hatékonyabban kötődnek a ráksejtekhez, de a véletlenszerű kiválasztás miatt elveszítjük azokat. Mivel tehát nem biztos, hogy a legmegfelelőbb szekvenciákat találtuk meg a fágbemutató technikával, ezért a kiválasztott peptid szerkezetében történő változtatásokat érdemes tovább tanulmányozni.

Általában az oligopeptidekben vannak olyan aminosavak, amelyek jelenléte fontos a receptorkötődés, vagy a megfelelő térszerkezet kialakítása szempontjából, így ezek megváltoztatása a hatás elvesztésével járhat. Más aminosavak azonban módosít-



3. ábra. A fágbemutatással kiválasztott és az alanin-szkenneléssel előállított daunomicin-peptidkonjugátumok szerkezetének sematikus ábrája

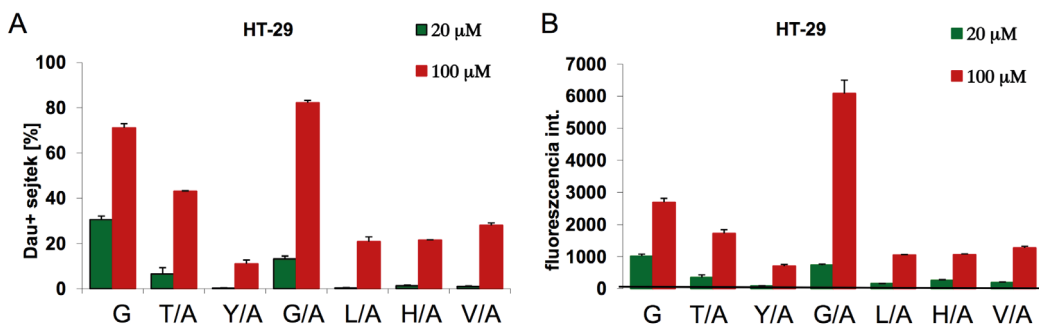
hatók a hatás elvesztése nélkül, sőt bizonyos esetekben még fokozható is a biológiai aktivitás. Ahhoz, hogy megtaláljuk a cserélhető, illetve nem cserélhető aminosavakat a szekvenciában, a peptidkémikusok az úgynevezett alanin-szkennelési (Ala scan) módszert alkalmazzák. Ennek során a szekvencia minden pozíciójában egyenként alaninra cserélik az ott található aminosavat. Ezek után megvizsgálják, hogy az adott változtatás hatására miként változik a biológiai aktivitás. Ha azt tapasztalják, hogy a hatás csökken, vagy netalán meg is szűnik, akkor az azt jelenti, hogy azt az aminosavat nem célszerű változtatni. Ha azonban a módosítás hatására nem következik be hatáscsökkenés, esetleg hatásfokozódás tapasztalható, akkor az a pozíció változtatható. Következő lépésben az így megismert pozícióba más aminosavakat

Zhang és munkatársai bizonyos vastagbél-ráksejtekre (HT-29) szelektív heptapeptideket (7 aminosav-tagszámú peptidet) keresnek fágbemutatásos eljárással. Három szelekciós ciklus után véletlenszerűen kiválasztott 50 klónt vizsgálva, a ráksejtekhez legszelektívebben kötődő heptapeptid szekvenciája sorrendben a következő aminosavakból állt: valin-hisztidin-leucin-glicin-

tuk, hogy a daunomicint (Dau) könnyen és hatékonyan lehet kapcsolni aminosav-csoporttal (Aoa) módosított peptidekhez oxim-kötésen keresztül. A daunomicin a sejtekben képes a DNS kettős spirál láncai közé beemelkedni (interkalálódni), ezáltal gátolva a sejtosztódást, vagyis a sejtek szaporodását. Így tudja gátolni többek között a daganatok növekedését. Azonban már azt is tudjuk, hogy a szabad Dau nem szabadul fel az oxim-kötésből, hanem egy olyan metabolitja keletkezik a sejtekben, amely tartalmazza a daunomicint, az aminosav-csoportot (Aoa; =N-O-CH<sub>2</sub>-CO-) és azt az aminosavat, amelyhez az Aoa kapcsolódik (Dau=Aoa-Aaa-OH, ahol az Aaa-OH a szabad

Konjugátum	Citosztázis (IC <sub>50</sub> (µM)) (24 órás kezelés + 48 óra)
Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH <sub>2</sub>	50,5 ± 5,5
Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAA-NH <sub>2</sub>	60,9 ± 3,1
Dau=Aoa-LRRY-VHLGAAT-NH <sub>2</sub>	> 100
Dau=Aoa-LRRY-VHLAYAT-NH <sub>2</sub>	14,0 ± 1,5
Dau=Aoa-LRRY-VHAGYAT-NH <sub>2</sub>	> 100
Dau=Aoa-LRRY-VALGYAT-NH <sub>2</sub>	26,8 ± 0,4
Dau=Aoa-LRRY-AHLGYAT-NH <sub>2</sub>	> 100

Táblázat. A daunomicin-peptidkonjugátumok tumorelles hatása



4. ábra. A fágbemutatással kiválasztott és az alanin-szkenneléssel előállított daunomicin-peptidkonjugátumok sejt felvételének tanulmányozása áramlási citométerrel. A) Azon sejtek aránya, amelybe bejutott a konjugátum; B) a bejutott konjugátum mennyiségével arányos fluoreszcencia intenzitás. (A G az eredeti szekvenciából készült konjugátumot jelenti, míg az X/A jelölések az adott aminosav X = treonin (T); tirozin (Y); glicin (G); leucin (L), hisztidin (H); valin (V) alaninra (A) történő cserével előállított konjugátumot jelenti)

is kipróbálnak (pozíciós szkennelés), amely során fényt derítenek arra, hogy milyen karakterű aminosav (savas, bázikus, apoláris, poláris) beépítése szolgálja a leghatékonyabb vegyületet. Az alábbiakban egy, a laboratóriumunkban végzett kísérlet alapján mutatnánk be ezt a folyamatot.

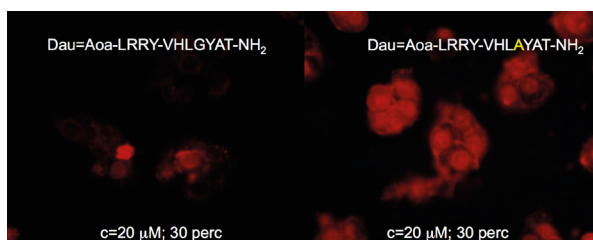
tirozin-alanin-threonin (az aminosavak három, illetve egybetűs kódjaival: Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr, illetve VHLGYAT). Kísérleteinkben tehát ezt az irányító peptidet kívántuk felhasználni, hogy egy kemoterápiás hatóanyagot, a daunomicint kapcsoljuk hozzá. Korábbi cikkeinkben már bemutat-

α-karboxilcsoportot tartalmazó adott aminosavat jelenti). Azt is bizonyítottuk, hogy a metabolit kötődési képessége a DNS-hez jelentősen függ a benne jelenlévő aminosav típusától. Tehát annak érdekében, hogy az Ala-szkennelés során ne kapjunk különböző metabolitokat, célszerű az irányító peptid és az oximkötött daunomicin (Dau=Aoa) rész közé egy olyan távtartó szekvenciát (spacer) beépíteni, ami minden kialakítandó új származékban azonos és a sejtekbe jutva könnyen lebomlik, mindig ugyanazt a metabolitot eredményezve. Így a konjugátumok hatása összehasonlítható és kiválasztható a legjobb irányító molekulá. Ezen megfontolásokból a korábbi tapasztalataink alapján a

leucinból, két argininből és egy tirozinból álló (Leu-Arg-Arg-Tyr; LRRY) tetrapeptid spacer választottuk és építettük be a konjugátumokba. Így minden esetben a legkisebb metabolit, ami a sejtben felszabadult és a hatásért felelős volt, a Dau=Aoa-Leu-OH egység volt. Mivel az irányító peptid egyik pozíciójában eredetileg is alanin volt, így ebben a helyzetben egyelőre nem végeztünk cserét, tehát a többi hat aminosav cseréjével összesen hat új konjugátumot állítottunk elő (3. ábra).

Ennek a hat konjugátumnak ráksejtekre gyakorolt toxikus hatását vizsgáltuk HT-29 sejteken és összehasonlítottuk a kontrollvegyület hatásával (táblázat). Az eredmények egyértelműen mutatták, hogy a szekvenciában a valin (V), a leucin (L) és a tirozin (Y) aminosavak cseréje nem megengedett. Ugyanakkor az a konjugátum, amelyben a glicint (G) cseréltük alaninra (A), hatékonyabban pusztította a ráksejteket (a kisebb IC<sub>50</sub> értékek a nagyobb toxikus hatást szemléltetik).

Ennek okát az úgynevezett sejtfelevéti vizsgálatokkal (áramlási citometria és fluoreszcencia mikroszkópia segítsé-



5. ábra. A fágbemutatással kiválasztott és a glicin/alanin (G/A)-cserével előállított daunomicin-peptidkonjugátumok sejtfelevételének tanulmányozása fluoreszcens mikroszkóppal 30 perces inkubálás után. (Az intenzívebb vörös szín, ami a daunomicin színéből adódik, a sejtbe jutott nagyobb mennyiségű konjugátumot jelenti.)

gével) magyaráztuk, amelyek igazolták, hogy a glicin-alanin (G/A)-csere által kapott konjugátum hatékonyabban jutott be a tumorsejtekbe, mint a többi konjugátum (4-5. ábra).

Az eredmények alapján a pozíciós szkenelési eljárást a glicin helyén végeztük el (6. ábra). Tehát az alanin után további aminosavakat építettünk be ebbe a pozícióba. A vizsgált aminosavak a savas karakterű glutaminsav (Glu, E), a bázikus lizin (Lys, K), a poláris karakterű szerin (Ser, S), treonin (Thr, T) és aszparagin



6. ábra. A pozíciós szkeneléssel előállított daunomicin-peptidkonjugátumok szerkezetének sematikus ábrája és a konjugátumok tumorelles hatása (IC<sub>50</sub> értékek HT-29 humán vastagbél-tumorsejteken (az értékek μM-ban értendők))

(Asn, N), valamint az apoláris leucin (Leu, L) és fenilalanin (Phe, F), továbbá a szerkezetben általában törést okozó ciklikus prolin (Pro, P) voltak.

A korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan végzett kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a prolin és a lizin beépítése ebbe a pozícióba nem célszerű. A glutaminsav, szerin, treonin és aszparagin (E, S, T, N) esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást az alaninnal módosított konjugátum hatékonyságához képest. Ellenben, ha nagy apoláris oldalláncot tartalmazó aminosavat fenilalanin vagy leucin (F, L) építettünk be a glicin helyére, akkor még erősebb tumorelles hatású konjugátumokhoz jutottunk. Ezeket a hatásbeli különbségeket szintén igazolni tudtuk a sejtfelevéti adatokkal. Tehát, amelyek anyag már kis koncentrációban is hatékonyabban bejut a ráksejtekbe, az jobban pusztítja azokat, míg az a konjugátum (prolint (P) tartalmazó), amely még magasabb koncentrációban is csak kis mértékben jut be a sejtekbe, az kevésbé hat a ráksejtekre. Összességében elmondhatjuk, hogy a fágbemutatásos eljárással kiválasztott peptid felhasználásával készült konjugátumhoz képest egy nagyságrenddel jobb hatású konjugátumot sikerült előállítanunk.

Vizsgálati eredményeink azt mutatják, hogy a fágbemutatásos eljárás alkalmas lehet tumorspecifikus irányító molekulák kiválasztására. Azonban célszerű az így nyert szekvencia módosításával kísérletezni még hatékonyabb vegyületek előállítása érdekében. Mindezek az apró lépések közelebbről hozhatják egy hatékony, sokrétű, személyre szabott rákgyógyítás megvalósítását.

A cikkben használt egy- és hárombetűs aminosav-kódok és további rövidítések jelentése: alanin: A (Ala); aszparagin: N (Asn); arginin: R (Arg); glicin: G (Gly); hisztidin: H (His); leucin: L (Leu); lizin: K (Lys); szerin: S (Ser); fenilalanin: F (Phe); tirozin: Y (Tyr); treonin: T (Thr); valin: V (Val); aminooxicetsav (Aoa); daunomicin (Dau).

## Irodalom

- Mező, G. (2011) Célzott tumorterápia peptidokkal. *Természet Világa* 142, 555-558.
- Mező, G., Hegedűs, R. Szabó, I. (2012) Célzott tumorterápia. *Természet Világa* 143, 448-451.
- Mező, G., Enyedi K.N. (2015) Egy anyag – két célpont. Lehetőségek a célzott daganatterápiában. *Természet Világa* 146, 307-310.
- Rivinoja, A., Laakkonen, P. (2011) Identification of homing peptides using the in vivo phage display technology. *Methods Mol. Biol.* 683, 401-415.
- Zhang Y., és mtsai. (2007) Panning and identification of a colon tumor binding peptide from a phage display peptide library. *J. Biomol. Screen.* 12, 429-435.
- Orbán, E., Mező, G., és mtsai. (2011) In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino Acids* 41, 469-483.
- Kiss, K., Szabó, R., Mező, G. (2016) Modification of peptide sequence selected for HT-29 colon cancer cell line by phage display to increase the anti-tumour activity of conjugates developed for targeted tumour therapy. *J Pept. Sci.* 22(52S), 183.

A Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) 2016-ban kiírt „Nemzeti versenyképességi és kiválósági program” (NVKP\_16) pályázat keretében jelentős összeggel támogat olyan innovatív megoldásokat eredményező kutatásokat, amelyek a „Kiemelkedő halálózási kockázattal járó betegségek gyógyításának eredményességét lényegesen javító nemzeti program” céljainak megfelelően, ezen betegcsoportok gyógyításában hozhatnak meghatározó új eredményeket. Az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) Kémiai Intézete és az ott működő MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport létrehozott egy konzorciumot, amelynek tagja a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézete és a ComInnEx Kutatási Fejlesztési Zrt., akik sikeresen pályáztak a támogatásra (NVKP\_16-1-2016-0036).