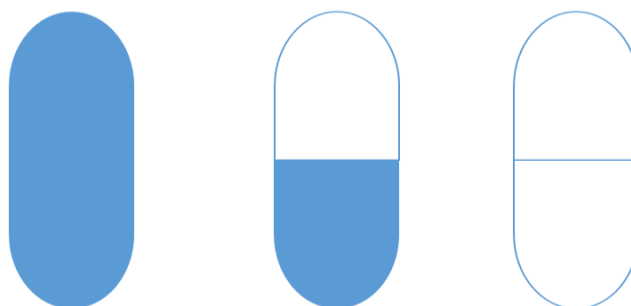


Test for aktivitet af dihydropyrimidin dehydrogenase forud for behandling med 5-fluorouracil- (i.v.), capecitabin- og tegafurholdige præparater

Version 1.1



FORFATTERGRUPPE:

Camilla Qvortrup, overlæge, ph.d. Onkologisk afdeling, Rigshospitalet, udpeget af DSKO

Per Damkier, overlæge, professor, ph.d. Afdeling for Klinisk biokemi og farmakologi, Odense Universitetshospital og Syddansk Universitet

Peter Stendahl Plomgaard, overlæge, ph.d. Klinisk biokemisk afdeling, Rigshospitalet, udpeget af DSKB

Fie Juhl Vojdeman, afdelingslæge, ph.d., Klinisk biokemisk afdeling, Sjællands Universitetshospital, udpeget af DSKB

Stig Ejdrup Andersen, overlæge, ph.d., Klinisk Farmakologisk Enhed, Sjællands Universitetshospital, Roskilde

Per Pfeiffer, overlæge, professor, ph.d. Onkologisk afdeling, Odense Universitets Hospital og Syddansk Universitet, udpeget af DSKO

HØRINGSPERIODE:

050121 - 050221

GODKENDT

17.03. 2021

REVISION

Opdateres ved fremkomst af nye væsentlige data ellers min. hver 3. år dvs. 2024

Oversigt over anbefalinger:

- Dihydropyrimidin dehydrogenase (DPD)-aktivitet bør vurderes før påbegyndelse af 1. systemiske behandling med 5-fluorouracil præparater (infusionsbaserede 5-fluorouracil-regimer, capecitabin eller tegafur)
- DPD-aktiviteten og dermed anbefalet initial dosering kan vurderes ved bestemmelse af *DPYD* genotype og/eller fænotype (se Tabel 1)
- Begge typer af test bør være tilgængelige for læger, der ordinerer 5-fluorouracil præparater
- Svarafgivelsen af såvel geno- som fænotype analyse bør standardiseres regionalt
- Tid til svar på analyser bør ikke overstige 3 arbejdsdage

Tabel 1: Oversigt over svar på test for DPD enzymaktivitet samt anbefalet dosis af 5FU.

Hvis begge tests udføres og der er uoverensstemmelse følger doseringsanbefaling altid svar med afvigende DPD-aktivitet og under hensyntagen til vanlige kliniske overvejelser.

Test:	Normal DPD-aktivitet:	Nedsat DPD-aktivitet:	Manglende DPD-aktivitet:
Genotype test:	<i>DPYD</i> varianter ikke påvist	Heterozygot for <i>DPYD</i> *13/ <i>DPYD</i> *2A/ rs67376798/ HapB3 #	Homozygot eller compound heterozygot for >1 <i>DPYD</i> variant
Fænotype test (plasma uracil):	< 16 ng/ml	≥ 16 ng/ml og < 150 ng/ml	≥ 150 ng/ml
Anbefalet dosering 5FU-præparater:	Vanlig dosering	Startdosering 50% dosis	Må ikke anvendes

#Se tabel 2 for de relevante specifikke numre og ændrede nukleotider.

Svarafgivelse bør indeholde information om funktion af DPD- enzymet samt umiddelbar beslutningsstøtte til klinikerne enten direkte i svaret eller som henvisning til internt dokument

Indledning

Lægemeddelstyrelsen udsendte d. 3. juni 2020 en meddelelse med titlen: *"5-Fluorouracil- (i.v.), capecitabin- og tegafurholdige præparater: Undersøgelse for DPD-mangel før iværksættelse af behandling for at identificere patienter med øget risiko for alvorlig toksicitet"* (1) til læger, der ordinerer kemoterapi. Heri anbefales det at bestemme aktiviteten af enzymet dihydropyrimidin dehydrogenase (DPD) forud for behandling med 5-fluorouracil og prodrugs hertil. Det anbefales også, at dosis justeres i forhold til aktiviteten således, at risikoen for svære 5-fluorouracil-relaterede bivirkninger og dødsfald reduceres. Denne anbefaling følger en anbefaling af d. 30. april 2020 fra det Europæiske Lægemeddelagentur, EMA, (2) med tilhørende ændringer i disse lægemidlers' produktresumé.

Analyse til bestemmelse af DPD-aktiviteten er ikke en del af tilgængelige standard tests. Der eksisterer flere typer af tests, der er krav til svartid, og det drejer sig om et stort antal patienter per år. Derfor valgte Dansk Selskab for Klinisk Onkologi (DSKO) og Dansk Selskab for Klinisk Biokemi (DSKB) at nedsætte en arbejdsgruppe mhp. at skabe national konsensus i forhold til implementering af test for nedsat aktivitet af DPD. Til arbejdsgruppen er herudover tilknyttet 2 kliniske farmakologer.

Formålet med nærværende anbefalinger er således at beskrive de kliniske forhold, metodemæssige forhold og anbefalinger af dosisjustering i forhold til DPD-aktiviteten.

Baggrund

Kemoterapi med 5-fluorouracil-præparater (5FU) har i mere end 50 år været anvendt til en lang række kræftsygdomme. Hovedparten af 5FU nedbrydes hurtigt til inaktive metabolitter. 5-10% af personer af kaukasiske afstamning nedbryder 5FU for langsomt, og hvis der anvendes standarddosering, er der øget risiko for meget alvorlige bivirkninger og endda risiko for død (3). Derfor har det siden december 2018 været et krav at vurdere DPD-aktivitet før første behandling med et 5FU præparat i Frankrig, og 30. april 2020 blev det ligeledes anbefalet af EMA (2).

Kemoterapi med 5FU-præparater indgår i standardbehandlingen af mange typer af solide tumorer – primært kræft udgående fra hele mave-tarm regionen inklusiv bugspytkirtel og galdeveje, men også brystkræft og kræft i hoved-hals regionen. 5FU kan gives både som monoterapi behandling og som en del af en kombinationsbehandling med andre cytostatika (eksempelvis platiner og topoisomerase-hæmmere) eller targeterede stoffer. Herudover gives 5FU også sammen med strålebehandling.

Der findes talrige forskellige 5FU regimer (4). Disse inkluderer iv regimer, hvor 5FU gives enten som bolus og/eller som kontinuerlig infusion over dage eller uger med pumpe, samt perorale pro-drugs (eks capecitabin og tegafur), der efter indgift omdannes til 5FU. I det følgende menes alle 5FU præparater, når der skrives 5FU med mindre andet er nævnt. Denne rapport omhandler udelukkende systemisk brug af 5FU.

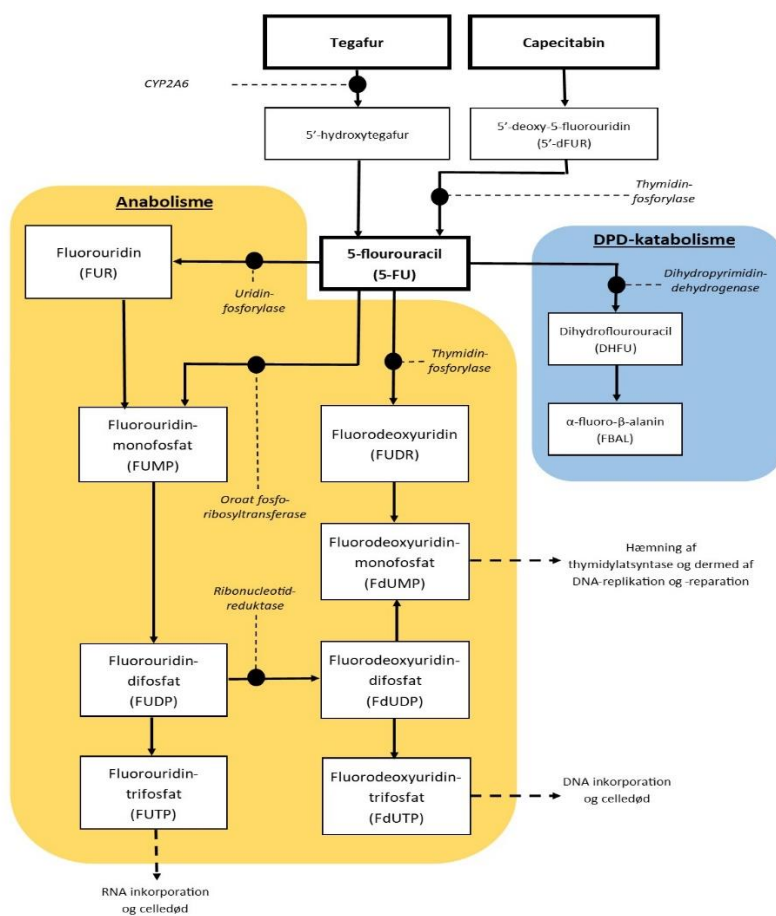
I Danmark vil omkring 4.500 nye patienter/år blive behandlet med 5FU (tal anslået efter henvendelse til DAHANCA, DECV, DPCG, DCCG, DBCG). Hos hovedparten af disse patienter indgår behandling med 5FU i den initiale systemiske behandling, og derfor er det nødvendigt at tiden til opstart af behandling opfylder kravene iht. kræftpakkeforløbene, der er standardiserede beskrivelser af patienternes samlede forløb inkl. anbefalede forløbstider for udvalgte elementer i standardforløbet. Dette betyder, at behandling oftest skal starte indenfor 10-12 kalenderdage, og dette giver ekstra store udfordringer til svartid på de nødvendige analyser.

Som eksempel er der i "pakkeforløb for patienter med kræft i tyk- og endetarm" (5) angivet forløbstider i forbindelse med udredning og initial behandling for tyk- og endetarmskræft. I praksis betyder det, at fra en elektronisk henvisning er modtaget i onkologisk afdeling til patienten skal være startet onkologisk behandling med kemoterapi må der maksimalt gå 10 kalenderdage. En samlet oversigt over de forskellige kræftpakkeforløb kan ses på sundhedsstyrelsens hjemmeside.

Omsætning af 5-fluorouracil

Metabolismen af 5FU er kompliceret (Figur 1). Det er kun en beskedent del af 5FU, der via anabole processer omsættes til de aktive metabolitter, som medierer den cytotoksiske effekt. DPD katalyserer omdannelsen af 5FU til dihydrofluorouracil (DHFU), der efterfølgende omdannes til fluoro-beta-ureidopropionat (FUPA) og endeligt fluoro-beta-alanin (FBAL). DPD er således det centrale og hastighedsbegrænsende enzym i omsætningen af 5FU til inaktive metabolitter (5–7). Leveren er det primære sted for katabolismen af 5FU, men DPD findes i mange celler/væv.

Figur 1. Skitse af 5-fluorouracils, tegafurs og capecitabins metabolisme og virkningsmekanisme. Centrale enzymer er anført med kursiveret skrift (3).



Sammenhængen mellem clearance af 5FU og *DPYD*-genotype/DPD-fænotyper (som nærmere beskrevet nedenfor) synes dog mindre klar. I et nyt studie fik 169 patienter målt 5FU clearance og bestemt geno- og fænotype. Sammenhængen mellem 5FU clearance og genotype såvel som fænotype var ikke overbevisende. I særlig grad var der stor variation i 5FU clearance blandt patienter med "normal" genotype og blandt patienter med "normal" uracil (<16 ng/ml) (9).

I forbindelse med behandling med 5FU-regimer vil 20-30 % af patienterne opleve svære 5FU relaterede bivirkninger primært i form af diarre (15% grad 3 eller 4) mucositis, neutropeni, febril neutropeni, thrombocytopeni, palmoplantart erytem (PPE) og kardielle symptomer. Hos 0,5-1 % af patienterne vil bivirkningerne være dødelige (7).

Ved nedsat aktivitet af DPD vil der forekomme højere koncentrationer af de aktive metabolitter medførende øget risiko for alvorlige bivirkninger. Hos patienter med nedsat DPD-aktivitet er hyppigheden af alvorlige bivirkninger væsentligt højere, op til 70-80 %. Den bedst kendte årsag til 5FU-relateret toksicitet er manglende eller nedsat aktivitet af DPD.

Dosering af 5-fluorouracil

5FU har et snævert terapeutisk vindue og udviser non-lineær kinetik (10). Ved standarddosering baseret på overfladeareal (BSA) fås en betydelig inter-individuel variation i plasmakoncentrationen (11), hvilket primært afspejler forskelle i omsætningshastigheden (12). Ud over varianter af gener, der koder for nøglezymer i omsætningen af 5FU, bidrager faktorer som alder, køn, sygdomsstadie, 5FU regime, lægemiddelinteraktioner og ko-morbiditet til denne variation (7).

Der er gjort flere forsøg på dosisjustering af 5FU ud fra koncentrationsmåling, som kan foretages ud fra en enkelt eller få koncentrationsmålinger (13). Sammenlignet med fast dosering efter BSA, viste en metaanalyse, at individualiseret dosering fordobler responsraten på 5FU uden at bivirkninger ændres væsentligt (13) men effekten på overlevelsen er mere usikker (10).

Der er publiceret algoritmer for dosistilpasning og studier, som foreslår, hvordan plasmakoncentrationen kan styres ind i et fastlagt interval på anbefalet areal under kurve (AUC) på 20–24 mg*h/l (14,15). Studier viser at med fast dosering efter BSA, er det kun 20-30% af patienter, som opnår det ønskede AUC, mens omkring halvdelen af patienterne opnår AUC under den anbefalede værdi (10,16). Mange praktiske forhold komplicerer denne tilgang til individualiseret dosering af 5FU. Der skal f.eks. tages en eller flere prøver ved hver behandling til en valid bestemmelse af AUC. Principielt forebygger metoden heller ikke toksicitet i første behandlingsserie, hvor der gives standarddosis, og dosisjustering ud fra bestemmelse af plasmakoncentrationer må aktuelt anses for utilstrækkeligt underbygget til at kunne implementeres i den kliniske rutine.

DPD-aktivitet bestemmelse

To overordnede principper anvendes globalt til at undersøge for klinisk betydende mangel på enzymet DPD (17). Det ene er en genotypetest med bestemmelse af minimum de 4 klinisk vigtigste varianter i form af enkelt-nukleotid-varianter (SNV) i *DPYD*-genet jf. CPIC guideline (18). Den anden er en fænotypetest (17), hvor plasmakoncentrationen af uracil (og i visse algoritmer også metabolitter af uracil) bestemmes vha. væskechromatografi-massespektrometri (LC-MS). Metoderne er beskrevet mere udførligt i appendix A.

Genotypetest

Den hyppigste årsag til nedsat DPD-aktivitet er SNVs i *DPYD*, der koder for DPD enzymet. Disse kan påvises vha. forskellige DNA-baserede metoder, som beskrevet i appendix A. De fleste varianter i *DPYD* er funktionelt betydningsløse, men enkelte nedsætter mængden eller aktiviteten af DPD. Patienter kan være heterozygote, homozygote eller *compound* heterozygote for en række *DPYD*-allelvarianter (19). Mere end 120 varianter er beskrevet; mange af disse er uden funktionel betydning, men nye potentielt klinisk relevante kommer stadig til (17). De fleste funktionelt betydende varianter medfører nedsat DPD aktivitet, men enkelte øger DPD aktiviteten (18,20).

Generelt udgør 4 SNVs i *DPYD* - rs56038477 / rs75017182 (HapB3), rs67376798, rs3918290 (*DPYD*2A*) og rs55886062 (*DPYD*13*) størstedelen af de funktionelle varianter i Vesteuropa og USA (tabel 2) (17). Der er beskeden viden om varianterne i andre populationer. Ovennævnte nomenklatur er i henhold til Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (20).

Tabel 2: De 4 hyppigste klinisk betydende enkelt nukleotid varianter.

Variant	SNP nummer (rs-nummer)	Enkelt nukleotidændring
<i>DPYD*13</i>	rs55886062	c.1679T>G
<i>DPYD*2A</i>	rs3918290	c.1905+1G>A
(ikke benævnt)	rs67376798	c.2846A>T
HapB3	rs56038477/rs75017182	c.1129-5923C>G

Heterozygote bærere af en af de 4 SNVs har nedsat DPD-enzymaktivitet sammenlignet med personer, der er homozygote for wild-type (wt) allelen (19). Den gennemsnitlige enzymaktivitet varierer imellem bærere af de respektive *DPYD*-varianter, men der ses en meget stor variation indenfor de enkelte genotyper og også et betydeligt overlap mellem grupperne. Samtidigt kan der fortsat forekomme svær toksicitet også hos patienter uden en af de nævnte *DPYD*-varianter (19). Ud over biologisk variation har andre faktorer betydning for 5FU-clearance f.eks. nyrefunktion, alder etc. Nogle patienter vil være bærere af andre og mere sjældne varianter af *DPYD*.

Dosering af 5FU baseret på genotype bestemmelse af DPD-aktivitet

I et prospektivt studie (21) blev 2.039 patienter screenet for varianten *DPYD*2A*. Der blev fundet 18 patienter (1 %), som var heterozygote for *DPYD*2A* varianten og som fik behandling med 50 % af standard 5FU dosis. Heraf fik 28 % (5/18) fortsat svære bivirkninger. Dette er i modsætning til en historisk kontrol gruppe med patienter, der ligeledes havde *DPYD*2A* heterozygot genotype, og som blev behandlet med vanlig 100 % dosering. Her udviklede 73 % (35/48) af patienterne svære bivirkninger. Blodprøver viste at 5FU koncentrationerne var sammenlignelige når der blev givet 50 % dosis til patienter med *DPYD*2A* genotype og 100 % til patienter uden påvist *DPYD*-variant. I gruppen uden påvist *DPYD*-variant fik 23 % (373/1613) svære bivirkninger. Ingen af de 18 patienter, der blev behandlet med dosis tilpasset efter genotype døde, hvorimod 10 % (5 af 48) i den historiske kontrol gruppe døde.

I et andet prospektivt studie (22) af 1.103 patienter behandlet med forskellige 5FU-præparater, havde 8 % (85 patienter) nedsat DPD-aktivitet bedømt ved genotypetest for én af 4 hyppigste varianter. Patienterne blev dosisjusteret på baggrund af fund af *DPYD*-varianterne. Patienter, der var homozygote el. compound heterozygote, modtog ikke behandling med 5FU. På trods af dosis justering var den 5FU relaterede svære toksicitet fortsat højere (39%) hos bærere af en *DPYD*-variant end hos patienter uden *DPYD* variant (23%). Ved sammenligning med en historisk kohorte, som ikke havde været genstand for dosis justering, var risikoen for 5FU-relateret toksicitet generelt lavere med den genotype-baserede dosering.

I et retrospektivt studie, inkluderende patienter behandlet med 5FU og strålebehandling, blev graden af svær toksicitet vurderet hos 2 grupper patienter med de 4 *DPYD*-varianter. Den ene gruppe blev behandlet med 5FU i 100 % standard dosis, mens en anden gruppe fik reduceret dosis 5FU sammenlignet med wildtype patienter. Risikoen for svære gastrointestinale bivirkninger og hæmatologiske bivirkninger hos 34 heterozygote patienter, som fik 5FU i standard dosis var øget (henholdsvis OR 2,58 og 4,19). Hos de 22 heterozygote patienter, der fik reduceret dosis 5FU, var der ikke øget risiko for svære gastrointestinale bivirkninger eller hæmatologisk toksicitet (23).

Der findes kun ganske få studier omhandlende effekt data hos patienter, der fik dosisreduceret 5FU grundet påvist nedsat DPD-aktivitet. Hos patienter med metastaserende kolorektal cancer fandtes ingen forskel i den progressionsfri- eller samlede overlevelse hos 37 patienter med nedsat DPD-aktivitet, som fik 50 % dosisreduktion og 37 matchede patienter med normal DPD, som fik 100 % dosis (24).

Fænotypetest

DPD-enzymet katalyserer omdannelsen af uracil til dihydrouracil (UH₂), hvorfor en nedsat DPD-aktivitet medfører en høj plasma uracil koncentration, og dermed kan plasma uracil anvendes som endogen markør for DPD-aktivitet.

Koncentrationen af uracil i plasma kan måles ved High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) kombineret med enten detektion med ultraviolet lys (UV) eller massespektrometer (MS). Der eksisterer ikke kommercielt tilgængelige CE-mærkede assays til plasma uracil måling, og der bør etableres et kvalitetssikringsprogram til monitorering af analysen på tværs af laboratorier i Danmark. Analysen er en batch analyse (et hold prøver samles sammen til analyse), hvor prøverne forberedes i løbet af dagen og analyseres natten over med svar den efterfølgende dag, hvilket giver en analysetid på 1 – 2 dage uden at indregne eventuel prøveforsendelse. For uddybende detaljer se appendix A. Af anbefalingen fra lægemiddelstyrelsen (1) fremgår det, at plasma uracil koncentration [U] mellem 16 ng/ml og 150 ng/ml er forenelig med nedsat DPD-aktivitet og en plasmakoncentration \geq 150 ng/ml er foreneligt med fuldstændig mangel på DPD-aktivitet. Grænsen på 16 ng/ml er baseret på kliniske studier med toxicitetsgrad 3 - 5 som primære effektmål (25–27). Grænsen på 150 ng/ml er baseret på ekspert rekommandation fra den Franske sundhedsstyrelse (28), hvor der er indsamlet data fra 38.862 patienter på tværs af Frankrig (kun udkommet på fransk). Kun 0,08% havde en uracil koncentration \geq 150 ng/ml.

I et Hollandsk studie (25) som var en del af et prospektivt studie med evaluering af genotypisk bestemmelse af DPD-aktivitet (se afsnit om genotype), fik 550 patienter målt [U] og [UH₂]/[U]. Forhøjet [U] var korreleret både til svære bivirkninger generelt (OR 5), svære gastrointestinale bivirkninger (OR 34), indlæggelser (OR 17) og død (OR 45).

I et Fransk studie (29) blev [U] og [UH₂]/[U] sammenlignet med *DPYD* genotype hos 3.680 patienter, men der var ingen oplysninger om behandling og bivirkninger. Henholdsvis 166 patienter (genotype: 4,4%), 249 patienter ([U]: 6,8%) og 423 patienter ([UH₂]/[U]: 11,5%) havde nedsat DPD-aktivitet. Der var ingen patienter med homozygot *DPYD* genotype, men 2 patienter havde compound heterozygot *DPYD* genotype. Den ene patient havde fænotypisk mangel på DPD ([U] = 320 ng/ml og [UH₂]/[U] = 0.4) men den anden patient havde normale værdier. Henholdsvis 2 og 3 patienter havde manglende DPD baseret på [U] og [UH₂]/[U] ratio.

I endnu et Fransk studie (30) blev 4 metoder sammenlignet (*DPYD*, [U], [UH₂]/[U] ratio og multi-parameter test) for at kunne forudsige livstruende bivirkninger (grad 4 og 5). Studiet har dog den svaghed at det er baseret på data fra 452 selekterede patienter (41 patienter døde) - indsamlet over næsten 20 år - som fik foretaget analyse af DPD-aktivitet fordi de havde udviklet svære bivirkninger efter behandling med standard-dosis 5FU. De rapporterede data bør derfor fortolkes med varsomhed: Blandt 280 patienter med normal [U] døde 8 (3%), blandt 178 patienter med nedsat DPD-aktivitet ([U] 16 - 150 ng/ml) døde 21 (12%) og hos 14 patienter med manglende DPD ([U] >150 ng/ml) døde 12 patienter (86%). Til sammenligning fandtes med genotype baserede test, at blandt patienter uden en af de 4 *DPYD* varianter, døde 21 patienter svarende til 51 % af de samlede 41 dødsfald.

Det bemærkes at der på trods af tydelige og konsistente retrospektive data ikke på nuværende tidspunkt findes prospektive data som understøtter den kliniske værdi af fænotypebestemmelse (17).

Andre metoder til bestemmelse af DPD-fænotype

Som alternativ til en solitær uracil bestemmelse, kan ratioen mellem dihydrouracil og uracil ([UH₂]/[U]) anvendes. I forhold til adskillelse mellem normal DPD-aktivitet og delvis DPD-mangel, eksisterer der ligeledes grænser for [UH₂]/[U], men disse er varierende fra studie til studie.

De senere år er flere fænotypiske test til screening for DPD-mangel kommet til, bl.a. direkte måling af DPD-aktivitet i PBMC og uracil breath test (12), men der er endnu ingen konsensus eller solid evidens, som definerer fænotypisk DPD-mangel (7). Desuden står teknisk metodevalidering, krav til laboratorieudstyr, svartider, organisation af rekvisition og svarafgivelse og utilstrækkelig diagnostisk præcision i vejen for en klinisk implementering.

Dosering af 5FU baseret på fænotype bestemmelse af DPD-aktivitet

Graden af 5FU-relateret toksicitet og dødsfald associeret til uracil koncentrationen i observationelle studier, men der er mangel på prospektive studier, der undersøger dosisjusteret 5FU på baggrund af fænotypisk bestemmelse af DPD-aktivitet. Det må rimeligvis forventes, at en halvering af 5FU dosis, på samme måde som til patienter med nedsat DPD-aktivitet bedømt ud fra genotype, vil reducere men ikke eliminere risiko for svære bivirkninger.

Hos patienter med nedsat DPD-aktivitet ([U] 16-150 ng/ml) tilrådes en halvering af start-dosis af 5FU.

Flere forskergrupper (primært franske) angiver at en kombination af geno- og fænotype kan forbedre den prædiktive værdi. En fransk gruppe har patenteret en underliggende algoritme (som ikke er publiceret) baseret på disse og individuelle karakteristika (30). Data må dog fortsat betragtes som utilstrækkelige til at kunne anbefale denne algoritme som standard.

Afrunding vedr. dosisbefalinger

DPD spiller ingen væsentlig rolle i omsætningen af lægemidler, som ikke indeholder 5FU. Derfor skal dosis af andre lægemidler *ikke* reduceres på baggrund af DPD-aktiviteten.

Da det ikke er alle med reduceret DPD-aktivitet (bestemt ved såvel geno- eller fænotype metode), der oplever alvorlige bivirkninger kan det i samråd med patienten overvejes at titrere dosis op baseret på tæt monitorering og vurdering af bivirkninger inklusive vurdering af *nadir* i hæmatologiske parametre.

Det bemærkes dog, at i det prospektive genotype- doserings studie af Henricks et al. (22) blev dosis kun øget hos 11 af 85 patienter med *DPYD*-varianterne – dvs. hos kun hos 13%. Hos 5 af de 11 blev dosisøgningen ikke tolereret og måtte igen dosisreduceres. Yderligere én patient måtte helt ophøre med behandling efter dosis øgning grundet bivirkninger. Hos de resterende 5 patienter kunne behandlingen fortsætte uændret efter dosisøgning.

Det er meget vigtigt at understrege, at mange af de underliggende data og dermed anbefalinger, uanset om man bruger geno- eller fænotypebestemmelse, er baseret på heterogene studiepopulationer, og de er ofte ekstrapoleret ud fra observationelle retrospektive data. Desuden er udfordringen at uanset valg af test vil den prædiktive værdi i forhold til alvorlige bivirkninger være suboptimal med en lav sensitivitet og lav positiv prædiktiv værdi og:

alle patienter kan, uanset at DPD-aktiviteten er vurderet normal (såvel bestemt ved geno- som fænotype), få alvorlige bivirkninger. Samtidigt er det ikke alle med afvigende geno- eller fænotype der vil opleve alvorlige bivirkninger.

Samlet vurderes det dog klart, at patienter hvor aktiviteten af DPD vurderes nedsat – bestemt ved enten genotype eller fænotype - har en væsentlig øget risiko for alvorlig toksicitet og død under behandling med 5FU. Det er derfor relevant at få foretaget fænotype- og/eller genotypetestning inden opstart af behandling med 5FU, og at reducere startdosis til patienter med identificeret nedsat DPD-aktivitet. Anbefalingen af reduceret startdosis for 5FU gælder, uanset om patienten får et regime med høj eller lav 5FU dosis, da de

onkologiske regimer typisk er baseret på maksimal tolerabel dosis hos patienter med normal 5FU-omsætning. Hvis der ikke udvikles bivirkninger i de første serier, kan der i samråd med patienten gradvis foretages dosis øgning. Ved total mangel på DPD-aktivitet er 5FU kontraindiceret. Det er naturligvis fortsat vigtigt at have kendte kliniske parametre med i overvejelserne omkring dosis.

Aktuelt er der en pågående international diskussion af hvilken test, der er den mest optimale, og der er ikke faglig konsensus herom. I Holland og Frankrig, som har klart den største erfaring med bestemmelse af DPD i den kliniske rutine, anvendes altovervejende genotypebestemmelse (31) (Holland), henholdsvis altovervejende uracil bestemmelse (Frankrig) (28). NHS England har i november 2020 udgivet en "*Urgent Policy Statement*" som anbefaler genotypebestemmelse før behandlingsstart – i dette statement er fænotypebestemmelse end ikke diskuteret (32).

Imidlertid vurderer herværende udvalg - som beskrevet ovenfor - at der kan være øget information ved at få foretaget såvel genotype- som fænotypetest og derfor bør begge test være tilgængelige for de læger, der ordinerer FU-præparater. Svartiden for begge test bør være på maksimalt 3 arbejdsdage, så opstart af behandlingen lever op til tider beskrevet i kræftpakkeforløbene.

Samlet dosis anbefalinger:

Det overordnede mål er at reducere risikoen for grad 4-5 bivirkninger, inklusive indlæggelser eller forlængelse heraf og død relateret til behandling med 5FU.

- Patientens dihydropyrimidin dehydrogenase-aktivitet bør vurderes før påbegyndelse af 1. systemiske behandling med 5-fluorouracil præparater. Dette gælder såvel behandling med infusionsbaserede 5-fluorouracil-regimer samt perorale prodrugs til 5-fluorouracil (capecitabin eller tegafur)
- Dihydropyrimidin dehydrogenase -aktiviteten kan vurderes ved:
 - Genotype bestemmelse, hvor de 4 mest almindelige single nukleotid varianter som er forbundet med nedsat dihydropyrimidin dehydrogenase -aktivitet bør indgå: *DPYD*13/DPYD*2A/ rs67376798/ HapB3*
 - Fænotype bestemmelse ved analyse af plasma koncentration af uracil
- Det er med den aktuelle evidens uklart, hvad der er den bedste test-strategi men:
 - Begge typer af test bør være tilgængelige for læger, der ordinerer 5-fluorouracil præparater
 - Tid til svar på analyser bør ikke overstige 3 arbejdsdage
- Behandling med 5-fluorouracil præparater er kontraindiceret hos patienter med meget lav eller ingen dihydropyrimidin dehydrogenase - aktivitet som defineret ved:
 - Plasma uracil koncentration ≥ 150 ng/ml
 - Homozygoti eller compound heterozygoti for en *DPYD* variant er forbundet med svært nedsat dihydropyrimidin dehydrogenase -aktivitet
- Patienter med nedsat dihydropyrimidin dehydrogenase-aktivitet bør opstarte 5-fluorouracil behandling i 50% dosis som defineret ved:
 - Plasma uracil koncentration ≥ 16 og < 150 ng/ml
 - Heterozygoti for *DPYD* variant er forbundet med nedsat dihydropyrimidin dehydrogenase -aktivitet

Under samtidig hensyntagen til kendte kliniske faktorer med betydning for 5-fluorouracil relaterede toksicitet.

- Gradvis dosis optitrering kan overvejes i samråd med patient ved fravær af 5-fluorouracil relaterede bivirkning inklusive vurdering af *nadir* hæmatologi efter den 1. dosisreducerede serie
- Behandling med 5-fluorouracil opstartes i vanlig standard dosis ved:
 - Plasma uracil koncentration < 16 ng/ml
 - Fravær af varianter af *DPYD*, som er forbundet med nedsat dihydropyrimidin dehydrogenase-aktivitet, hvor de 4 mest almindelige forekommende er undersøgtUnder vanlig hensyntagen til kendte kliniske faktorer med betydning for 5-fluorouracil relaterede toksicitet.
- Svaret på både geno- og fænotype analyse bør være operationelt og handlingsanvisende for klinikerne, fx med tre patientkategorier (Normal DPD-aktivitet, Nedsat DPD-aktivitet og manglende DPD-aktivitet) ledsaget af konkrete anbefalinger af initialdosis.

Referencer

1. Opfølgning på udsendelse af sikkerhedsinformation om fluorouracil mv. og test for DPD-mangel [Internet]. Lægemiddelstyrelsen. [henvist 6. december 2020]. Tilgængelig hos: <https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/nyheder/2020/opfoelgning-paa-udsendelse-af-sikkerhedsinformation-om-fluorouracil-mv-og-test-for-dpd-mangel/>
2. FRANCISCO EM. Fluorouracil and fluorouracil related substances (capecitabine, tegafur flucytosine) containing medicinal products [Internet]. European Medicines Agency. 2019 [henvist 6. december 2020]. Tilgængelig hos: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/fluorouracil-fluorouracil-related-substances-capecitabine-tegafur-flucytosine-containing-medicinal>
3. Ejdrup Andersen S, Herluf Paulsen N, Pfeiffer P, et al. Fæno- eller genotypetest for dihydropyrimidin dehydrogenase-mangel før fluoropyrimidinbehandling? Ugeskr Læger 2021;183:V07200556
4. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol. 2016;27(8):1386–422.
5. Sundhedsstyrelsen. Pakkeforløb for kræft i tyk- og endetarm. Kbh.; 2012.
6. Miura K, Kinouchi M, Ishida K, et al. 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. Cancers. 2010;2(3):1717–30.
7. Meulendijks D, Cats A, Beijnen JH, Schellens JHM. Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity – Ready for clinical practice? Cancer Treat Rev. 2016 50:23-34.
8. Miura K, Shima H, Takebe N, et al. Drug delivery of oral anti-cancer fluoropyrimidine agents. Expert Opin Drug Deliv. 2017;14(12):1355–66.
9. Dolat M, Macaire P, Goirand F, et al. Association of 5-FU Therapeutic Drug Monitoring to DPD Phenotype Assessment May Reduce 5-FU Under-Exposure. Pharmaceuticals. 2020;13(11):416.
10. Yang R, Zhang Y, Zhou H, et al. Individual 5-Fluorouracil Dose Adjustment via Pharmacokinetic Monitoring Versus Conventional Body-Area-Surface Method: A Meta-Analysis. Ther Drug Monit. 2016;38(1):8.
11. Felici A, Verweij J, Sparreboom A. Dosing strategies for anticancer drugs: the good, the bad and body-surface area. Eur J Cancer. 2002;38(13):1677–84.
12. van Staveren MC, Jan Guchelaar H, van Kuilenburg ABP, Get al. Evaluation of predictive tests for screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Pharmacogenomics J. 2013;13(5):389–95.

13. Beumer JH, Chu E, Allegra C, et al. Therapeutic Drug Monitoring in Oncology: International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Recommendations for 5-Fluorouracil Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105(3):598-613
14. Morawska K, Goirand F, Marceau L, et al. 5-FU therapeutic drug monitoring as a valuable option to reduce toxicity in patients with gastrointestinal cancer. *Oncotarget.* 2018;9(14):11559–71.
15. Kaldate RR, Haregewoin A, Grier CE, et al. Modeling the 5-Fluorouracil Area Under the Curve Versus Dose Relationship to Develop a Pharmacokinetic Dosing Algorithm for Colorectal Cancer Patients Receiving FOLFOX6. *The Oncologist.* 2012;17(3):296–302.
16. Gamelin E, Delva R, Jacob J, et al. Individual Fluorouracil Dose Adjustment Based on Pharmacokinetic Follow-Up Compared With Conventional Dosage: Results of a Multicenter Randomized Trial of Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(13):2099–105.
17. Knikman JE, Gelderblom H, Beijnen JH, et al. Individualized Dosing of Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy to Prevent Severe Fluoropyrimidine-Related Toxicity: What are the Options? *Clin Pharmacol Ther.* 2021;109(3):591-604.
18. Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(2):210–6.
19. Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS et al. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2015 (16):1639-50
20. <https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/>.
21. Deenen MJ, Meulendijks D, Cats A, et al. Upfront Genotyping of DPYD*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis. *J Clin Oncol.* 2016;34(3):227-34
22. Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM, et al. DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *Lancet Oncol.* 2018;19(11):1459–67.
23. Lunenburg CATC, Henricks LM, Dreussi E, et al. Standard fluoropyrimidine dosages in chemoradiation therapy result in an increased risk of severe toxicity in DPYD variant allele carriers. *Eur J Cancer* 2018;104:210–8.
24. Henricks LM, Siemerink EJM, Rosing H, et al. Capecitabine-based treatment of a patient with a novel *DPYD* genotype and complete dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency:

Complete DPD deficiency caused by a novel *DPYD* genotype. *Int J Cancer*. 2018;142(2):424–30.

25. Meulendijks D, Henricks LM, Jacobs BAW, et al. Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity. *Br J Cancer*. 2017;116(11):1415–24.
26. Etienne-Grimaldi M-C, Boyer J-C, Beroud C, et al. New advances in *DPYD* genotype and risk of severe toxicity under capecitabine.. *PLOS ONE*. 2017;12(5):e0175998.
27. Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, et al. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: A comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett*. 2007;249(2):271–82.
28. RECHERCHE DE DÉFICIT EN DIHYDROPYRIMIDINE DÉSHYDROGÉNASE EN VUE DE PRÉVENIR CERTAINES TOXICITÉS SÉVÈRES SURVENANT SOUS TRAITEMENT COMPORTANT DES FLUOROPYRIMIDINES” December 2018, Haute Autorité De Santé, France.
29. Pallet N, Hamdane S, Garinet S, et al. A comprehensive population-based study comparing the phenotype and genotype in a pretherapeutic screen of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Br J Cancer*. 2020;123(5):811–8.
30. Capitain O, Seegers V, Metges J-P, et al. Comparison of 4 Screening Methods for Detecting Fluoropyrimidine Toxicity Risk: Identification of the Most Effective, Cost-Efficient Method to Save Lives. *Dose Response* 2020 14;18(3):1559325820951367
31. Lunenburg CATC, van der Wouden CH, Nijenhuis M, et al. Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene–drug interaction of *DPYD* and fluoropyrimidines. *Eur J Hum Genet*. 2020;28(4):508–17.
32. <https://www.england.nhs.uk/wp-content/uploads/2020/11/1869-dpyd-policy-statement.pdf>.

Appendix A

Test for aktivitet af dihydropyrimidin dehydrogenase forud for behandling med 5-Fluorouracil- (i.v.), capecitabin- og tegafurholdige præparater

Version 1.1

Bestemmelse af fænotype:

Dihydropyrimidin dehydrogenase (DPD) enzymet omdanner uracil til dihydrouracil, men enzymet omdanner også 5FU til den inaktive metabolit, hvorfor der ved nedsat aktivitet af DPD er øget risiko for toxicitet. Enzymet er primært udtrykt i leveren, men også i perifere mononukleære celler (PMC). Til bestemmelse af DPD-aktiviteten har man forskningsmæssigt målt enzymets aktivitet i PMC med radioaktivt mærket substrat og dette opfattes som referencemetoden. Dette biologiske assay er ikke egnet til diagnostik, da det er tids- og arbejdskrævende, samt svært at standardisere. Plasmakoncentrationen af uracil kan udnyttes som endogen markør for DPD-aktiviteten.

Præanalytiske forhold:

Der er beskrevet døgnvariation for plasmakoncentrationen af uracil, som svinger med laveste niveau kl. 17 og højeste kl. 5 fra henholdsvis 8,8 ng/ml til 12,2 ng/ml (1). Jf. den franske anbefaling er døgnvariationen ikke så betydelig, at prøvetagningstidspunktet skal standardiseres. Det er ydermere beskrevet, at plasma uracil falder i timerne efter et måltid (14,2 ng/ml til 9,2 ng/ml) (2), hvilket den franske anbefaling ikke forholder sig til. Der foreligger ingen data om døgnrytmevariation hos patienter med kræft. Grænseværdien på 16 ng/ml og 150 ng/ml, er baseret på prøver udtaget uden tids- eller faste restriktioner, hvorfor samme præ-analytiske forhold er hensigtsmæssige. Det anbefalede prøvemateriale er plasma. Hvis prøven udtages ved stuetemperatur, skal prøvetagningsrøret kølecentrifugeres inden for 1 time og 30 minutter og plasma afpipetteres. Hvis prøverøret tages på køl, skal kølecentrifugering ske indenfor 4 timer, hvorefter plasma afpipetteres (https://www.has-sante.fr/jcms/c_2891090/fr/methodes-de-recherche-d-un-deficit-en-dihydropyrimidine-deshydrogenase-visant-a-prevenir-certaines-toxicites-severes-associees-aux-traitements-incluant-une-fluoropyrimidine-5-fluorouracile-ou-capecitabine). Uracil er beskrevet som stabilt i EDTA-plasma ved stuetemperatur i 6 timer og i køleskab 3-6 dage(3). Fryses plasmaet er uracil stabilt ved -20 i 6 måneder og tolererer 3x fryse/tø cykler (4).

Analyse:

Koncentrationen af uracil i plasma kan måles ved **High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)** kombineret med enten detektion med ultraviolet lys (UV) eller massespektrometer (MS). Der

eksisterer ikke kommercielt tilgængelige CE-mærkede assays til plasma uracil måling og materialer til kalibratorer og internkvalitetssikring (dag til dag variation) skal for nuværende fremstilles "in house". Grænserne for delvis manglende og fuldstændigt manglende DPD-aktivitet er bestemt med metoder, som har en analytiske variation (CV) mellem 8,6 og 12,4 % (5,6). Til ekstern kvalitetssikring (variation mellem laboratorier og sikring af korrekt koncentrationsniveau) er identificeret ét program i Europa: Assurance Qualité des Laboratoires de Biologie Medicale Association (ASQUALAB) Paris, Frankrig. Analysen er en batch analyse (et hold prøver samles sammen til analyse), hvor prøveforberedelsen udføres i løbet af dagen og instrumentet typisk analyser natten over med svar den efterfølgende dag. Dette giver en analysetid på 1 – 2 dage.

Grænser og fortolkning:

Måleresultat afgives som en kontinuerlig variabel medfølgende grænser til fortolkning som angivet i tabel 1 i hoveddokument.

Bestemmelse af genotype:

Genotype kan bestemmes vha. flere typer af metoder, der undersøger for 4 single-nucleotide varianter (SNVs), der dækker ca. 98% af de varianter i *DPYD* genet, som kan bidrage til nedsat DPD-aktivitet hos kaukasere (7–9).

Præanalytiske forhold:

Analysen af DNA kræver ingen særlige præanalytiske forhold. Der anvendes som oftest enten Citrat eller EDTA fuldblod, der kan sendes med post ved stuetemperatur.

Analyse:

Sanger sekventering:

Sekvensanalyse af nukleotider i DNA fragmenter under 1000 bp. Guld standard for validering af DNA sekvens. Sekvens aflæses vha. gel-elektroforese/kapillær-elektroforese og varianter aflæses i vha. specialdesignet software.

Taqman assay:

Probe(r) er designet til at binde omkring området med den DNA variant, der undersøges for. Derfor detekteres kun de varianter, proberne kan bindes til. Fund skal evt. verificeres med Sanger sekventering, men dette er ikke rutine i alle laboratorier.

Direkte metode (LAMP):

Kræver alene EDTA-fuldblod – ingen DNA oprensning. Loop-mediated amplification af den region rundt om aktuel DNA variant der detekteres med fluorescens ved smeltekurve analyse. Der er 6 specifikke primere i LaCARs kit, og de analyseres i særskilte kørsler.

Grænser og fortolkning:

Afhængig af software til svarafgivelse, kan varianter aflæses fra rådata indlæst i eksternt analysesoftware (for Sanger og Taqman) eller aflæses vha. software, som er indbygget i analyseapparatet, hvor data eksporteres til (LaCAR). Det kræver teknisk trænet personale at aflæse disse metoder. Der henvises i øvrigt til instrukser i brug af specifikt software.

Testkapacitet, svartid og analyseomkostninger

Inden udgangen af 2021 forventes det, at alle regioner enten udbyder eller sørger for adgang til begge typer af tests. Det samlede nationale behov for testkapacitet for begge typer tests er omkring 5000 analyser/år.

For begge typer test er svartiden afhængig af både prøvens transporttid til laboratoriet og af antallet af analyser på laboratoriet, da de udføres som 'batch'-analyser (Tabel 1, appendix). Således forventes en samling af analyserne på få laboratorier at kunne nedbringe svartiden, da der i så fald kan analyseres prøver på alle hverdage. For genotypedestesten vil der være stordriftsfordele ved at anvende Taqman målemetoden efterfulgt af Sanger sekventering i udvalgte tilfælde. For fænotype testen skal prøverne sendes frosset og den korte svartid vil kræve hyppige forsendelser, hvilket er omkostningsfyldt især mellem regioner.

Svarafgivelsen er ikke standardiseret, og for især genotypedestesten vil det være hensigtsmæssigt, at svarafgivelsen standardiseres på tværs af laboratorier og teknik for at lette klinikernes fortolkning af svaret og tilpasning af behandlingen med 5FU (se tabel 1 under oversigt over anbefalinger i Nationalkonsensus). For fænotypedestesten eksisterer grænseværdier til identifikation af patienter med nedsat og fuldstændig manglende DPD-aktivitet, som angivet i rekommandationen fra Lægemiddelstyrelsen.

Efter henvendelse til laboratorier, hvor analyserne er under opsætning/udføres som rutine i efteråret 2020 er et skøn over prisen per analyse varierer fra 150 til 850 kr. ekskl. transport afhængigt af det udførende laboratories prisberegningsmodel. Derfor vil regionerne skønsmæssigt blive påført en årlig merudgift. Hertil kommer engangsudgifter til opbygning af testkapaciteten men samtidigt forventes reduceret udgift til indlæggelser udløst af 5FU toksicitet.

Tabel 1: oversigt over metode, opsætning, prøvehåndtering og svartid i Danmark i 2020

Test	Metode	Opsætning	Prøvehåndtering	Svartid
Genotype- bestemmelse (4 SNVs)	Sanger sekventering	DNA oprenses. Analysen sættes op på klinisk biokemisk apparat.	Fuldblod sendes ved stuetemperatur samme dag	5 hverdage + evt. transport
Genotype- bestemmelse (4 SNVs)	TaqMan probebaseret assay	D.o.	D.o.	2-5 hverdage + evt. transport
Genotype- bestemmelse (4 SNVs)	Loop- mediated isothermal amplification (LAMP)	Kommercielt kit fra LaCAR.	D.o.	Samme dag + evt. transport
Fænotype- bestemmelse	Plasma uracil koncentrations - bestemmelse	LC-MS, 'in-house' metode	Prøven centrifugeres og afpipetteres inden 90 min. Plasma/serum sendes på køl/frost samme dag.	2-5 hverdage + evt. transport

LC-MS: Væskekromatografi-massespektrometri.

Referencer:

1. Jacobs BAW, Deenen MJ, Pluim D, et al. Pronounced between-subject and circadian variability in thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme activity in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* september 2016;82(3):706–16.
2. Henricks LM, Jacobs BAW, Meulendijks D, et al. Food-effect study on uracil and dihydrouracil plasma levels as marker for dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human volunteers: Food effect-study on U and DHU levels. *Br J Clin Pharmacol.* december 2018;84(12):2761–9.
3. Chavani O, Jensen BP, Strother RM, et al. Development, validation and application of a novel liquid chromatography tandem mass spectrometry assay measuring uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil, 5,6-dihydro-5-fluorouracil, α -fluoro- β -ureidopropionic acid and α -fluoro- β -alanine in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* august 2017;142:125–35.
4. Büchel B, Rhyn P, Schürch S, et al. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients: Simultaneous analysis of endogenous and fluorinated pyrimidines. *Biomed Chromatogr.* januar 2013;27(1):7–16.
5. Pallet N, Hamdane S, Garinet S, et al. A comprehensive population-based study comparing the phenotype and genotype in a pretherapeutic screen of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Br J Cancer.* 2020;123:811–8.
6. Meulendijks D, Henricks LM, Jacobs BAW, et al. Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity. *Br J Cancer.* 2017;116:1415–24.
7. Rosmarin D, Palles C, Church D, et al. Genetic Markers of Toxicity From Capecitabine and Other Fluorouracil-Based Regimens: Investigation in the QUASAR2 Study, Systematic Review, and Meta-Analysis. *J Clin Oncol.* 2014;32:1031–9.
8. Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2015; 16: 1639–50
9. Andersen SE, Paulsen NH, Pfeiffer P, et al. Fæno- eller genotypetest for dihydropyrimidindehydrogenasemangel før fluoropyrimidinbehandling. *Ugeskr Læger* 2021;183:VO7200556