

**Utvikling av HPLC metode for måling av ganciklovir og
beskrivelse av ganciklovirs farmakokinetikk hos
organtransplanterte etter administrering av valganciklovir**

Hovedfagsoppgave for graden candidata pharmaciae

Christin Nupen Hansen



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo
November 2006

**Utvikling av HPLC metode for måling av ganciklovir og
beskrivelse av ganciklovirs farmakokinetikk hos
organtransplanterte etter administrering av valganciklovir**

Hovedfagsoppgave for graden candidata pharmaciae

Christin Nupen Hansen



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo
November 2006

Veileder:
Professor Anders Åsberg

FORORD

Først og fremst vil jeg få takke professor Anders Åsberg for god veiledning gjennom dette året som hovedfagsstudent. Takk for at du har vært tilgjengelig for meg under hele prosessen, og stilt krav til meg. Ditt gode humør og engasjement har gitt meg inspirasjon til arbeidet og gjort dagene mer innholdsrike!

Jeg vil også takke stipendiat Pål Falck for gode råd gjennom prosjektet. Du stilte deg til disposisjon da alt så mørkt ut i forbindelse med NONMEM.

Takk til bioingeniørene Hilde og Siri for blodprøvetaking.

En stor takk til de ansatte på avdeling for farmasøytisk biovitenskap. Dere har vært veldig inkluderende - og aldri har jeg spist så mange gode kaker i løpet av ett år...

Takk Mari, for språklige råd.

Borghild, min ”samboer”, takk for faglige diskusjoner og all moroa vi har hatt dette året. Selv i den hektiske innspurten har latteren sittet løst.

Sist, men ikke minst vil jeg rette en stor takk til Hanne for heltemodig innsats som blodgiver. Uten deg hadde jeg aldri kunnet gjennomføre denne oppgaven.

Oslo, November 2006

INNHALDSFORTEGNELSE

1. FORKORTELSER.....	6
2. SAMMENDRAG.....	7
3. INNLEDNING.....	9
3.1. Grunnleggende farmakokinetikk.....	9
3.1.1. Absorpsjon	9
3.1.2. Distribusjon.....	9
3.1.3. Eliminering.....	9
3.1.4. Clearance.....	10
3.1.5. Distribusjonsvolum	11
3.1.6. Halveringstid.....	11
3.1.7. Biotilgjengelighet.....	12
3.2. Populasjonsfarmakokinetikk	12
3.2.1. Én-kompartmentsmodell	13
3.2.2. To-kompartimentmodell.....	14
3.2.3. NONMEM.....	16
3.3. Bioanalyse	18
3.3.1. Prøveopparbeidelse	18
3.3.2. High Performance Liquid Chromatography – HPLC	20
3.3.3. Deteksjon.....	21
3.4. Cytomegalovirus.....	21
3.4.1. Cytomegalovirus-infeksjon	21
3.4.2. Risikofaktorer.....	23
3.4.3. Strategier for å hindre CMV-sykdom.....	24
3.4.4. Strategier for behandling av CMV-sykdom	25
3.5. Ganciklovir/Valganciklovir	25
3.5.1. Farmakodynamikk.....	25
3.5.2. Farmakokinetikk.....	26
3.5.3. Viral resistens mot GCV	27
3.5.4. Bivirkninger	29
3.6. Dagens monitorering av VGCV/GCV-terapi	29

3.7. VICTOR-PK studien.....	29
3.8. Mål.....	30
4. MATERIALE OG METODER	31
4.1. Kjemikalier	31
4.2. Utstyr	31
4.3. Strukturformler og fysikalsk-kjemiske egenskaper.....	32
4.4. Pasienter og prøvemateriale	32
4.5. Analysemetode	34
4.5.1. Fast-fase ekstraksjon	34
4.5.2. Kromatografi	35
4.5.3. Validering av HPLC-analysemetode.....	36
4.6. NONMEM.....	40
5. RESULTATER OG DISKUSJON.....	44
5.1. Validering.....	44
5.2. Analysemetode.....	53
5.2.1. Tilbakevendende problemer under analysene	55
5.2.2. Justeringer av opprinnelig analysemetode	55
5.3. NONMEM.....	58
5.3.1. Én-kompartimentmodell.....	59
5.3.2. To-kompartimentmodell.....	60
6. KONKLUSJON.....	64
7. REFERANSER.....	65
8. APPENDIKS.....	70
8.1 Studieprotokoll for VICTOR-PK	70
8.2 Artikkel	79
8.3 Inputfil til bruk i NONMEM.....	86
8.3.1 IV-gruppen	86
8.3.2 PO-gruppen	97
8.3.3 Doseintervall-gruppen.....	109

1. FORKORTELSER

ACN	Acetonitril
ACV	Aciklovir
AUC ₂₄	Plasmakonsentrasjonskurve over 24 timer
BID	To ganger daglig
BSA	Body surface area (arealet av kroppsoverflaten)
CL	Clearance
CMV	Cytomegalovirus
CV	Variasjonskoeffisienten (relativt standardavvik)
GCV	Ganciklovir
GFR	Glomerulær filtrasjonsrate
IS	Intern standard
i.v.	Intravenøs
k _{abs}	Absorpsjonskonstanten
k _{el}	Eliminasjonskonstanten
LLOQ	Lower limit of quantification
p.o.	Peroral
PRISMA	kontinuerlig dialyse og filtrasjon
QC-prøve	Quality control samples (kontrollprøver)
QD	En gang daglig
R ²	Regresjonskoeffisienten
SD	Standardavvik
STS-metode	Standard two stage method
t _{1/2}	Halveringstid
TID	Tre ganger daglig
VACV	Valaciklovir
Vd	Distribusjonsvolum
VGCV	Valganciklovir

2. SAMMENDRAG

En analysemetode for måling av ganciklovir (GCV) i plasma, urin og dialysat ble utviklet og validert. Metoden ble utarbeidet med hensikt til bruk i en pågående farmakokinetisk studie.

Prøveopparbeidelsen besto av fast-fase ekstraksjon på hydrophilic-lipophilic balance (HLB)-kolonner. Til separasjon av GCV ble det benyttet omvendt fase high performance liquid chromatography (HPLC) hvor kolonnen var av typen Zorbax SB-Aq. Som intern standard (IS) ble det benyttet aciklovir (ACV). Mobil fase besto av 90 % fosfatbuffer pH 2,1 tilsatt heptansulfonsyre som motion og 10 % acetonitril (ACN).

Valideringen av metoden ga tilfredsstillende resultater i henhold til krav gitt av Food and Drug Administration (FDA). Utbyttet var mellom $44,4 \pm 4,9$ % og $48,1 \pm 2,4$ % for GCV og $46,7 \pm 3,7$ % for IS. Nøyaktigheten viste et relativt avvik mellom -10 % og -14,7 %.

Presisjonen ble uttrykt ved variasjonskoeffisienten (CV), og var mellom 10,2 % og 12,6 %, og mellom 1,5 % og 15,8 % for henholdsvis interdag og intradag. Laveste kvantifiseringsgrense (LLOQ) ble bestemt til 0,1 µg/mL. Presisjonen var 2,9 % CV og nøyaktigheten 17,5 % (relativt avvik). Standardkurvene viste god linearitet for plasma, urin og dialysat med regresjonskoeffisienter (R^2) bedre enn 0,993. Tre fryse-tine sykluser påvirket ikke stabiliteten til stoffene, og postpreparativ stabilitet ga en maksimal relativ konsentrasjonsforandring på 5,5 %.

Etter valideringen var utført ble metoden benyttet til analyse av plasmaprøver fra transplanterte pasienter i en klinisk studie. Det oppsto en del problemer under analysen av pasientprøverne. Det ble derfor utført en rekke mindre justeringer av metoden, og slik den fremstår i dag vil den være godt egnet til konsentrasjonsmålinger av GCV i plasma, urin og dialysat.

Til sammen ble det analysert plasmaprøver fra 41 pasienter, hvorav 21 ble behandlet med intravenøs GCV og 20 med peroral VGCV. For 2 av pasientene som fikk GCV og 2 av de som fikk VGCV ble det innenfor 3 doseintervall samlet flere prøver enn hos de resterende pasientene. Hos disse pasientene kunne konsentrasjonsmålingene gi informasjon om eksponering av legemidlet over en kortere tidsperiode, AUC_{0-24} .

Pasientprøvene skulle brukes til populasjonsmodellering ved hjelp av NONMEM. Grunnet begrenset tid til disposisjon ble det forsøkt satt opp én-og to-kompartimentmodeller kun for 19 av de pasientene som fikk intravenøs GCV. Det ble tatt utgangspunkt i at parameterne vekt, høyde og kroppsoverflate (BSA) er assosiert med distribusjonsvolumet (V_d), og at clearance (CL) assosieres med nyrefunksjonen. Modellen beskriver ikke på nåværende tidspunkt farmakokinetikken til GCV og VGCV siden modellen ikke er optimalisert, men videre utvikling av modellene vil forhåpentligvis gi bedre estimater av de farmakokinetiske parameterne.

3. INNLEDNING

3.1. Grunnleggende farmakokinetikk

Farmakokinetikk beskriver hvordan kroppen behandler et legemiddel, og hvordan det beveger seg i kroppen. Den beskrives per definisjon i tre faser: absorpsjon, distribusjon og eliminasjon. De fire viktigste parameterne er clearance (CL), distribusjonsvolum (Vd), halveringstid ($t_{1/2}$) og biotilgjengelighet [1].

3.1.1. Absorpsjon

Absorpsjon beskriver den prosessen som transporterer legemidlet fra administrasjonsstedet og inn i det systemiske kretsløpet. Normalt følger absorpsjonen 1. ordens kinetikk, der hastigheten er proporsjonal med konsentrasjonen på absorpsjonsstedet. Legemidler som administreres intravenøst har ingen absorpsjonsfase siden de gis direkte i kretsløpet og blandes hurtig inn i blodvolumet [2].

3.1.2. Distribusjon

Etter at legemidlet har nådd sirkulasjonen vil det distribueres videre ut i kroppen. Ved hjelp av blodflyten vil legemidlet nå de organer det skal virke i, men også eliminasjonsorganer som lever og nyrer. Avhengig av legemidlers fysiske egenskaper og proteinbindingsgrad i både plasma og vev, fordeles de i varierende grad til forskjellige vev.

3.1.3. Eliminasjon

Legemidler skilles ut av kroppen enten uforandret eller etter at de har blitt omdannet til metabolitter. Begge prosessene defineres som eliminasjon, kroppens irreversible tap av legemiddel.

Dersom legemidlene elimineres uforandret kalles prosessen ekskresjon. Organer som er ansvarlig for ekskresjon er blant andre nyrer, lunger og kroppsvæsker. Felles for alle er at de eliminerer hydrofile stoffer mer effektivt enn lipofile.

Gjennom metabolisme blir legemidlet kjemisk forandret til en metabolitt før det skilles ut av kroppen. Et legemiddel metaboliseres via to hovedtyper biokjemiske reaksjoner, hovedsakelig i lever, før det elimineres. Fase I reaksjoner består av enten oksidasjon, reduksjon eller hydrolyse, prosesser som alle gjør stoffene mer reaktive (og i noen tilfeller mer toksiske enn den opprinnelige forbindelsen). Fase II involverer konjugering, og resulterer som oftest i et inaktivt produkt som er vesentlig mer hydrofilt. Ved fase I introduseres som regel en hydroksylgruppe til molekylet, hvorpå det i fase II hektes på en større substituent, for eksempel en glukuronyl-, sulfat- eller acetyl-gruppe. Resultatet av metabolismen er økt eliminasjon via nyrer ved at stoffene har blitt gjort mer polare.

3.1.4. Clearance

Clearance er et mål på effektiviteten av eliminasjonsprosessen. Parameteren beskriver hvor raskt et legemiddel skilles ut av kroppen, og er avhengig av forholdet mellom eliminasjonshastigheten og plasmakonsentrasjonen av legemidlet:

$$CL = \text{eliminasjonshastigheten} / \text{plasmakonsentrasjonen} = V / C_{pl}$$

Benevnningen på CL er volum per tidsenhet, ofte i ml/min eller L/time.

De fleste legemidler elimineres med 1. ordens kinetikk, hvor en konstant fraksjon av legemidlet blir fjernet fra kroppen per tidsenhet. Dersom mekanismen for eliminasjonen av et gitt legemiddel blir mettet vil kinetikken beskrives med 0. orden. Her blir en konstant mengde av legemidlet fjernet per tidsenhet.

Eliminasjon av legemidler skjer i flere organer, hovedsakelig via nyrer og lever, og i mindre grad gjennom blant andre lunger og hud. Summen av hver separate CL gir total CL:

$$CL_{\text{tot}} = CL_{\text{renal}} + CL_{\text{hepatisk}} + CL_{\text{andre}}$$

CL_{renal} er eliminasjon av uforandrede legemidler via nyrene, CL_{hepatisk} er metabolisme av legemidler i lever og/eller utskillelse i galle [1]. Faktorer som er assosiert med CL er blant andre renal funksjon, kroppsvekt, kroppens overflateareal, hjertets slagvolum,

legemiddelinteraksjoner, blodtilførsel til lever og nyrer, genetik, hepatisk funksjon og plasmaproteinbindingsgrad [2].

3.1.5. Distribusjonsvolum

Tilsynelatende distribusjonsvolum defineres som det væskevolumet som kreves for å oppnå samme konsentrasjon av en gitt dose av et legemiddel som plasmakonsentrasjonen. Det er ikke et fysiologisk volum.

$$Vd = \text{total mengde legemiddel i kroppen} / \text{plasmakonsentrasjon} = Q / Cpl$$

Et stort Vd indikerer at legemidlet i stor grad er fordelt i kroppsvev, mens et lavt Vd indikerer at det i stor grad befinner seg i plasma. Vd sier derfor noe om hvor mye legemiddel som befinner seg utenfor plasma, men ikke noe om i hvilke organer det befinner seg i. Vd er avhengig av bindingsgrad til plasma- og vevs-proteiner og fordelingskoeffisienten av legemidler i fett. For et gitt legemiddel kan faktorer som pasientens vekt, alder, kjønn, kroppsfasong og sykdommer føre til forskjellig Vd [2].

3.1.6. Halveringstid

Halveringstiden er den tiden det tar å redusere plasmakonsentrasjonen av et legemiddel med 50 %.

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{el} \text{ (ved 1. ordens kinetikk)}$$

$$k_{el} = CL / Vd$$

k_{el} er eliminasjonskonstanten, og den uttrykker fraksjonen av total mengde av legemiddel i kroppen som blir fjernet per tidsenhet, og er en funksjon av CL og Vd.

$t_{1/2}$ er et resultat av forholdet mellom disse parameterne. Det ses sjelden en forandring i Vd, så dersom $t_{1/2}$ forandres skyldes dette som regel en forandring i CL. Årsaken til dette er at renal og hepatisk CL antas å lettere la seg påvirke enn proteinbindingsgrad og fordelingskoeffisienter [2].

3.1.7. Biotilgjengelighet

Definisjonen på biotilgjengelighet er den prosentandelen eller fraksjonen av den administrerte dosen som når det systemiske kretsløpet. Variasjoner i enzymaktivitet i tarmvegg og lever (1.pass metabolisme), gastrisk pH og intestinal motilitet, vil alle bidra til interindividuelle forskjeller i biotilgjengeligheten for et bestemt legemiddel gitt oralt [2]. For et legemiddel som administreres i det systemiske kretsløpet (intravenøst) anses biotilgjengeligheten å være 100 %, da de nevnte faktorene ikke vil påvirke denne administrasjonsveien. Bestemmelse av biotilgjengeligheten blir gjort ved å sammenligne kroppens eksponering for legemidlet, arealet under kurven (AUC), i en definert tidsperiode etter henholdsvis peroral og intravenøs administrering:

$$\text{Biotilgjengelighet} = (\text{AUC}_{\text{p.o.}} / \text{AUC}_{\text{i.v.}}) * 100\% \quad (\text{forutsatt at dosene er like})$$

3.2. Populasjonsfarmakokinetikk

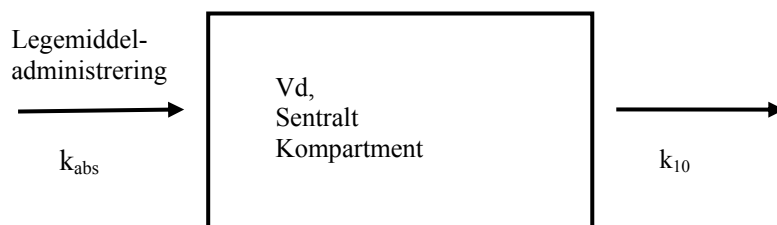
En farmakokinetisk populasjonsmodell bruker matematiske ligninger/formler for å kortfattet beskrive kvantitative relasjoner mellom farmakokinetiske parametere. Det blir gjort antagelser med hensyn til legemidlers bevegelse i komplekse biologiske systemer, og matematiske modeller blir deretter brukt for å beskrive prosessene absorpsjon, distribusjon og eliminasjon. De essensielle faktorene som styrer de kinetiske prosessene blir vanligvis parameterisert som differensialligninger. Parameterne blir så estimert ved å tilpasse modellen til eksperimentelle data, kjent som variabler. En uavhengig variabel (tid) er relatert til en avhengig variabel (plasmakonsentrasjon). Basert på eksperimentelle data av disse variablene, vil differensialligningene gi estimater av den avhengige variabelen med hensyn til den uavhengige. Det har blitt utviklet ulike dataprogrammer til å gjøre disse avanserte beregningene.

Farmakokinetiske ”kompartimentmodeller” presenterer kroppen som et system bestående av flere kompartiment som er i likevekt med hverandre. Et kompartiment er ikke en reell fysiologisk eller anatomisk avgrensning, men blir sett på som vev eller en gruppe av vev som har lik blodtilførsel og legemiddelaffinitet. Transporten inn og ut av det enkelte kompartiment beskrives ved hjelp av hastighetskonstanter, og siden legemidlene kan elimineres fra systemet kalles modellene for åpne modeller. Det grunnleggende prinsippet bak kompartimentkonseptet er at konsentrasjonen i et kompartiment, som funksjon av tid, er et resultat av massetransport

inn og ut av dette. Hastigheten på massetransporten følger som regel 1. ordens kinetikk, ved at det er en proporsjonal sammenheng mellom legemidlets konsentrasjon i kompartment og transporthastigheten ut av det. ”Mammillary-modellen” er den kompartmentmodellen som blir mest brukt innenfor farmakokinetikken [3]. Det sentrale kompartment representerer plasma og høyt perforerte vev som raskt inngår likevekt med legemidlet. De perifere kompartment representerer forskjellige vev som bruker lengre tid på å oppnå distribusjonslikevekt. Dersom parameterverdier er kjent, kan mengde legemiddel i et hvilket som helst kompartment i systemet enkelt la seg estimere. Én- og to-kompartmentmodeller er de vanligste ”mammillary-modellene”.

3.2.1. Én-kompartmentsmodell

Én-kompartmentmodeller består kun av ett kompartment, det sentrale (figur 1). Modellen vil tilstrekkelig kunne beskrive legemidler med veldig rask fordeling til vev eller liten distribusjon ut i kroppen. Dersom administreringen er intravenøs vil hele dosen nå det sentrale kompartment, og biotilgjengeligheten er 100 %.



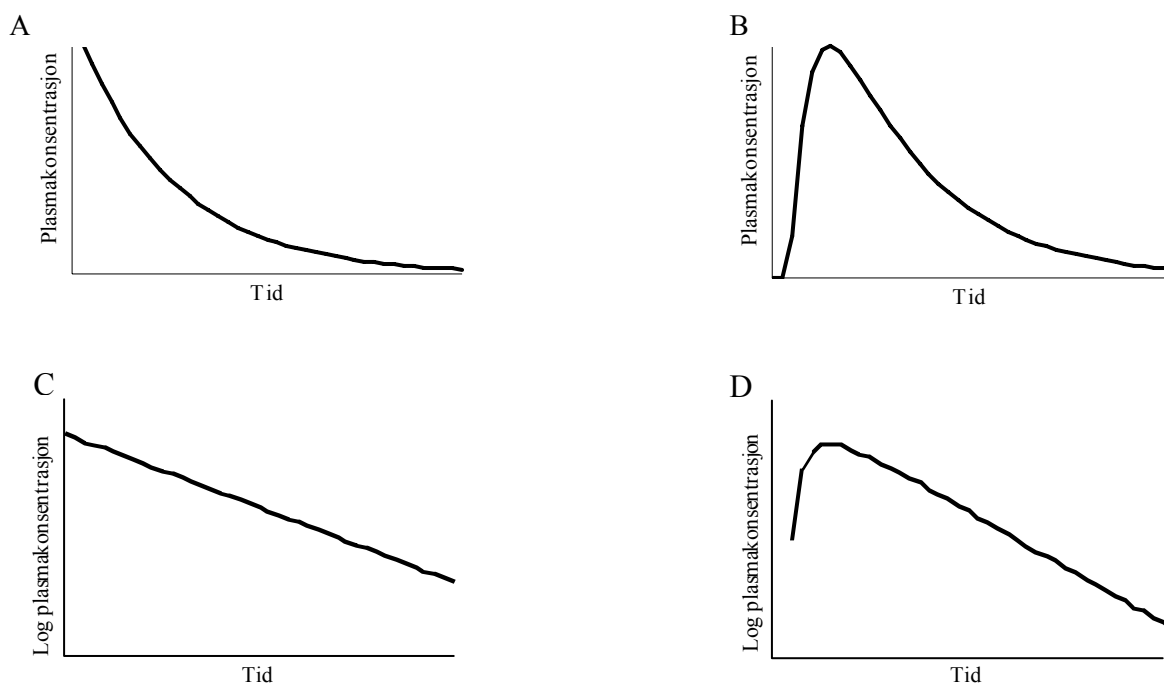
Figur 1. Én-kompartiment modell. $k_{10}=k_{el}$, k_{abs} er absorpsjonskonstanten.

Forholdet mellom konsentrasjonen C og eliminasjonshastigheten beskrives som:

$$C(t) = C_0 * e^{-kt} \text{ (ved 1. ordens kinetikk)}$$

der C_0 er konsentrasjonen ved tiden 0, k er eliminasjonskonstanten og t er tiden.

Modellen gir et monoeksponentielt kurveforløp ved 1. ordens kinetikk (figur 2). Legemidlet kan elimineres ut av kompartment enten via ekskresjon eller metabolisme. Volumet av kompartment tilsvarer V_d , og den initielle konsentrasjonen vil være mengde legemiddel (Q) dividert på V_d . Senere konsentrasjoner vil være avhengig av eliminasjonshastigheten [4].

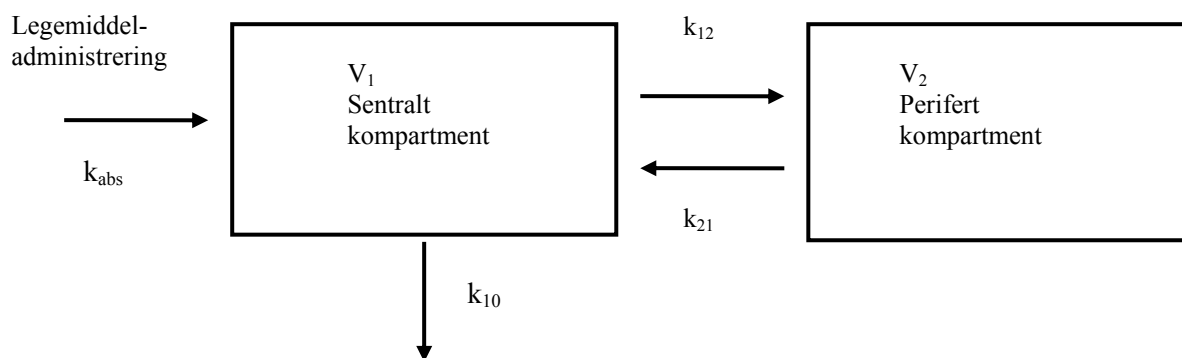


Figur 2. Kurveforløp etter i.v. (A, C) og p.o. (B, D) administrering som følge av én-kompartimentmodell. A og B viser normal plott, C og D semilogaritmisk plott.

3.2.2. To-kompartimentmodell

Ulike vev i kroppen har forskjellig blodtilførsel, fordelingskoeffisient og kapillærpermeabilitet for legemidler. Én-kompartimentmodellen vil derfor for mange legemidler være en kraftig forenkling av fysiologien, og innføring av ett eller flere perifere kompartment vil bidra til å gi et bedre bilde av distribusjonen av legemidlene over tid.

I en to-kompartimentmodell vil det sentrale kompartment representere plasma, mens det perifere representerer forskjellige vev som bruker lengre tid på å oppnå likevekt (figur 3). Legemiddelmolekylene kan gå inn og ut av det perifere kompartment kun via det sentrale.



Figur 3. To-kompartimentmodell. V_1 og V_2 er volumet i henholdsvis det sentrale og perifere kompartment. k_{abs} er absorpsjonskonstanten. k_{12} er hastighetskonstanten for eliminasjon fra det sentrale kompartment over i perifert kompartment, k_{21} fra perifert til sentralt og k_{10} er eliminasjonskonstanten ut av systemet.

På samme måte som for én-kompartimentmodellen er biotilgjengeligheten 100 % dersom dosen blir gitt intravenøst.

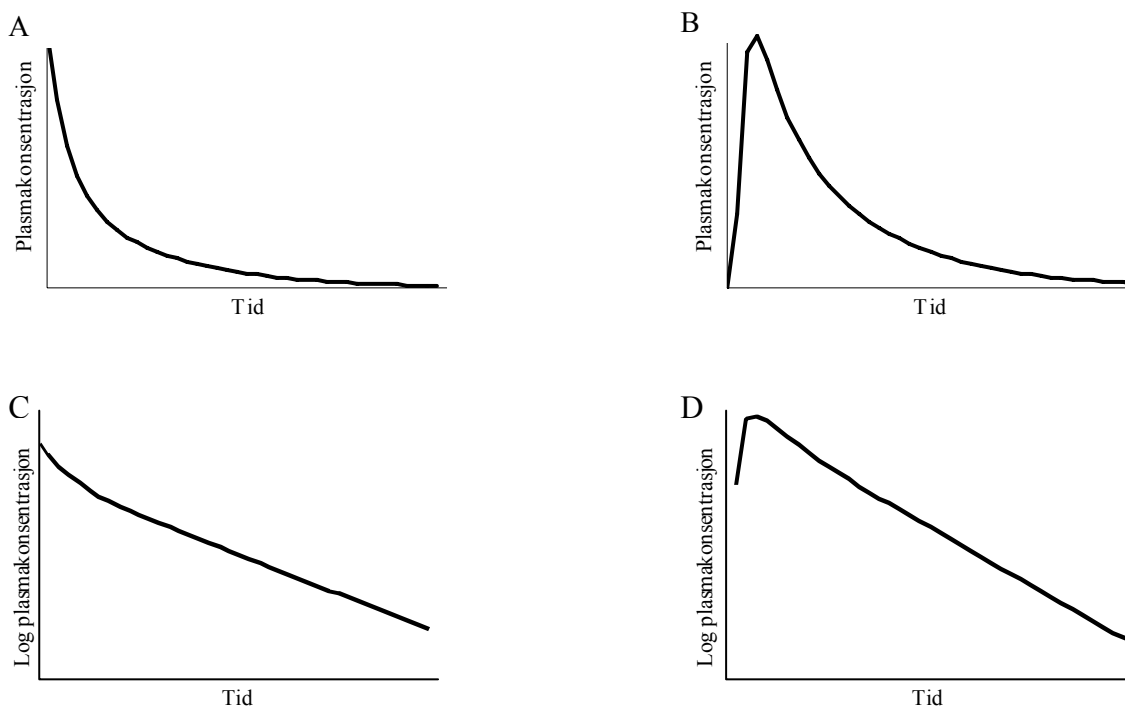
Modellen gir et biekspontielt kurveforløp ved 1. ordens kinetikk. I en to-kompartimentmodell har man to faser, α og β . α -fasen er distribusjon av legemiddel mellom det sentrale og perifere kompartment. β -fasen tilsvarer eliminasjonen, og er vanligvis langsom i forhold til α -fasen. Summen av α - og β -fasen gir det totale bildet av plasmakonsentrasjonen. Dersom en semilogaritmisk kurve av plasmakonsentrasjonene ikke gir en rett linje, bør man legge inn ett kompartment til.

Forholdet mellom konsentrasjonen og eliminasjonshastigheten vil nå være avhengig av både det sentrale og perifere kompartment:

$$C(t) = A_0 * e^{-k\alpha*t} + B_0 * e^{-k\beta*t} \quad (\text{ved 1.ordens kinetikk})$$

der A_0 konsentrasjonen beregnet fra α -fasen ved tiden 0, B_0 er konsentrasjonen beregnet fra β -fasen ved tiden 0. k_α og k_β er eliminasjonskonstantene for henholdsvis α - og β -fasen.

I kurveforløpene i figur 4 utgjør α - og β -fasen hver sin likning, men her er de summert og vises slik det vil ses in vivo.



Figur 4. Kurveforløp etter i.v. (A, C) og p.o. (B, D) administrering som følge av to-kompartimentmodell. A og B viser normal plott, C og D viser semilogaritmisk plott..

Populasjonsfarmakokinetikk er studien av farmakokinetiske likheter og forskjeller mellom individer. Det baseres på målinger av legemiddelkonsentrasjoner i biologiske væsker hos pasienter i en populasjon av interesse [5]. Målet med en populasjonsmodell er å beskrive og lagre kliniske erfaringer av et legemiddels oppførsel i en viss gruppe eller populasjon av pasienter [6]. De farmakokinetiske populasjonsmodellene kan involvere et stort antall pasienter med heterogene karakteristikk [5]. Populasjonsmodellering av et legemiddels bevegelse i kroppen vil være svært nyttig dersom legemidlet har et smalt terapeutisk vindu og/eller stor interindividuell variabilitet.

3.2.3. NONMEM

Tradisjonelle farmakokinetiske studier involverer hyppig innsamling av blodprøver over tid av noen få individuelle pasienter og måling av legemiddelkonsentrasjon i hver prøve. For hver enkelt pasient blir AUC beregnet fra plasmakonsentrasjonen, AUC beskriver total eksponering av legemidlet over tid. Ved hjelp av dette arealet kan de grunnleggende farmakokinetiske parameterne som k_{el} , V_d og CL beregnes. Til slutt brukes gjennomsnittet av alle pasientene til å beskrive populasjonen. Det er lett å estimere nøyaktige parametere, men

modellen krever mange prøvetakninger. Ulempen med denne ”standard two stage method” (STS) er at kun noen få homogene, friske individer blir inkludert i studien, og at doseringen i forskjellige pasienter derfor må bestemmes individuelt [3].

NONMEM er et dataprogram, og står for ”NONlinear Mixed Effects Modeling”. Per i dag er NONMEM det dataprogrammet som blir mest brukt innenfor farmakokinetisk modellering. Modellering ved hjelp av NONMEM krever ikke like hyppig blodprøvetakning som ved STS-metoden. Programmet estimerer farmakokinetiske parametere direkte fra populasjonsfordelingen uten å bestemme verdien i hvert enkelt individ på forhånd. Prinsippet er to byggesteiner, en strukturell modell og en modell bestående av tilfeldige effekter. NONMEM bygger opp en modell som skal tilsvare realiteten, og tester denne opp mot reelle målinger som er utført.

Den strukturelle modellen består av kjente egenskaper av hvert individ, for eksempel vekt, høyde, glomerulær filtrasjonsrate (GFR) osv. Effekten er fiksert, dvs. at en parameter er avhengig av en annen.

De tilfeldige effektene er uforutsigbare og kan ikke bestemmes på forhånd. Det er to kilder til denne tilfeldige variasjonen, interindividualitet og intraindividualitet. Med interindividualitet menes at et individ er forskjellig fra et annet sett fra naturens side, og skyldes ikke feil i metoden. Intraindividualitet er forstyrrelser mellom prediksjonen av modellen for det enkelte individ og den målte observasjonen. Dette blir sett på som støy, og inkluderer feil i legemiddeldose, tid for måling, analysene osv.

Det finnes flere måter å beskrive variasjonen av de tilfeldige effektene. Den proporsjonelle error-modellen blir brukt mest, og gir oftest et best bilde av variasjonen. Denne kalles også konstant CV-modell (constant coefficient of variation model). Error er her normalfordelt, men er proporsjonell med størrelsen av prediksjonen.

Interindividuell variasjon kan beskrives på følgende måte:

Individuell verdi_i = Gjennomsnittsverdi + η_i

hvor individuell verdi er verdien målt i individ i og η (eta) er forskjellen mellom den målte verdien og gjennomsnittsverdien i populasjonen. η har per definisjon gjennomsnitt 0 og variasjon ω^2 (omega). Eta (η) er byggesteinen for interindividuell variabilitet [7]. Ofte må

interindividuell variasjon log-transformeres før den blir tilnærmet normalfordelt. Som vist i kontrollfilen (figur 9 og 10), vil NONMEM uttrykke den interindividuelle variasjonen ved hjelp av konstant CV-modell:

$$X_j = X * (1 + \eta_j^X)$$

hvor X er den typiske populasjonsverdien på CL eller Vd, η_j^X representerer forskjellen mellom person j og den predikerte gjennomsnittsverdi. Verdien av η_j^X er normalfordelt med gjennomsnitt 0 og varians ω^2 og j er variabelen for person j .

Intraindividuell variasjon kan beskrives på følgende måte:

Observert verdi = Sann verdi + Error

$$Y_{\text{obs}} = TY + \varepsilon$$

hvor Y_{obs} er den observerte verdi, TY den sanne verdien (typical value of Y) og ε (epsilon) er en normalfordelt tilfeldig variabel med per definisjon gjennomsnitt 0 og variasjon σ^2 . Dette er NONMEMs syn på støy, og epsilon er byggesteinen for intraindividuell variabilitet.

Programmet uttrykker også den intraindividuelle variasjonen ved hjelp av den proporsjonelle error-modellen (figur 9 og 10):

For intraindividuell variasjon:

$$Y_{\text{obs}} = TY * (1 + \varepsilon_j)$$

hvor Y er den observerte verdien av CL eller Vd, TY er den sanne verdi av Y , ε_j representerer forskjellen mellom målt og sann verdi. Verdien av ε_j er normalfordelt med gjennomsnitt 0 og varians σ^2 .

3.3. Bioanalyse

For å kunne beskrive farmakokinetikken til legemidler kreves det gode konsentrasjonsbestemmelser. Det er derfor viktig med tilgang til en analysemetode som gir sikre og nøyaktige resultater som kan brukes til det formål som er tiltenkt.

3.3.1. Prøveopparbeidelse

De fleste biologiske prøver trenger en form for prøveopparbeidelse før de kan injiseres i et separasjonssystem. Målet med prøveopparbeidelsen er å kvitte seg med komponenter som kan ødelegge separasjonssystemet, som interfererer med analysen av de aktuelle stoffene, eller foreta en oppkonsentrering av de aktuelle analyttene slik at de kan detekteres og eventuelt

kvantifiseres. Fast-fase og væske-væske ekstraksjon er viktige metoder for prøveopparbeidelse.

Væske-væske ekstraksjon baserer seg på fordelingen av et stoff mellom to ikke-blandbare væsker. For å ekstrahere et stoff fra den ene væskefasen til den andre optimaliseres fordelingskoeffisienten ved valg av løsningsmiddel, pH og ionestyrke.

Fast-fase ekstraksjon baserer seg på et stoffs fordeling mellom væske (mobil fase) og overflaten til et fast materiale, en sorbent (stasjonær fase). For å kunne isolere analytten på overflaten til sorbenten, må sorbenten inneholde kjemiske grupper som gir interaksjon med analytten. Denne interaksjonen må være sterkere enn interaksjonen mellom stoffet og væsken det er løst i. Samtidig bør ikke sorbenten ha grupper som fører til at forurensninger i prøven interagerer.

Gjennomføringen av en fast-fase ekstraksjon strekker seg over fire trinn. Først må kolonnen kondisjoneres, dette forbereder kolonnen på å ta imot prøven. Kjødene av kjemiske grupper fuktes slik at de "reiser" seg opp og dermed økes det aktive overflatearealet. Som oftest brukes et organisk løsemiddel til dette, for eksempel metanol. Det organiske løsningsmiddelet må vaskes ut av kolonnen med et vandig løsningsmiddel før prøvepåsettingen finner sted. Når prøveløsningen transporteres gjennom kolonnen, blir de aktuelle stoffene retardert. Også komponenter med svakere interaksjon enn analytten kan bli retardert, det er derfor viktig å la en vaskeløsning passere kolonnen etter prøvepåsettingen for å skylle ut disse stoffene. Siste trinn i ekstraksjonen er elueringen hvor det foregår en selektiv desorpsjon av analytten. Elueringsmidlet bør være så sterkt at det bryter bindingene mellom analytt og sorbent, men ikke så sterkt at det eluerer forurensninger som retarderes sterkere av sorbenten enn det analytten gjør.

Fordelene med fast-fase ekstraksjon er blant andre at det ikke stilles krav til at elueringsmidlene er blandbare eller ikke blandbare med prøven, det finnes et bredt utvalg av sorbenter, liten bruk av løsningsmidler og muligheten for å automatisere selve ekstraksjonen. Mange løsningsmidler kan derfor brukes, og siden volumet av disse er så små reduseres forurensningene og avfallskostnadene. Utvalget av sorbenter sikrer bedre selektivitet ved at det kan velges retensjonsmekanisme. Automatiseringen gjør at resultatene ikke er personavhengige og dermed også ofte tidsavhengige, ulempen er at analysene tar lenger tid.

De forskjellige formene for fast-fase ekstraksjon er omvendt fase-, normal fase- og ionebytter-ekstraksjon. Omvendt fase ekstraksjon benyttes for å konsentrere og rense upolare stoffer fra polare prøveløsninger, normal fase for å ekstrahere stoffer med polare funksjonelle grupper fra ikke-vandige løsninger og ionebytter ekstraksjon til å isolere ioniserte stoffer fra vandige prøveløsninger [8].

3.3.2. High Performance Liquid Chromatography – HPLC

Et HPLC-system består av et reservoar mobil fase, en pumpe, injektor, kolonne, detektor og integrator. Systemet baserer seg på kromatografiske prinsipper, stoffene fordeles ulikt mellom mobil og stasjonær fase. I dette tilfellet er den mobile fase en væske, mens den stasjonære fasen er et fast materiale som er impregnert eller bundet til bæresubstansen. Det eksisterer to definerte systemer avhengig av polariteten til den stasjonære og mobile fase, normal fase separasjon og omvendt fase separasjon. I dag dominerer omvendt fase separasjon innenfor HPLC. Her anvendes en upolar stasjonærfase og en polar mobilfase. De vanligste stasjonærfasene består av modifisert silika hvor det til overflaten er bundet langkjedede alkylgrupper, substituerte alkylgrupper eller andre hydrokarboner, mobil fase består oftest av en blanding av vann og en organisk komponent som er fullstendig blandbar med vann.

De viktigste interaksjonene mellom stoff og stasjonærfase er van der Waalske krefter, relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. Størrelsen på de hydrofobe gruppene til analyttene vil derfor ha størst effekt på retensjonen, de minst hydrofobe stoffene elueres ut før de mer hydrofobe. Parametere som kan påvirke retensjonen er mobilfasens sammensetning, pH, stasjonærfase, temperatur og tilsetning av salter, syrer og baser.

Ionparkromatografi baserer seg på ekstraksjon av ioniske substanser fra vandige løsninger over i organiske faser ved hjelp av ionpardannere. Ved omvendt fase kromatografi tilsettes det et motion til den mobile fase. Dette inneholder store upolare grupper, og vil danne ionpar med den ioniserte prøven. Affiniteten til dette nye ionparet er vesentlig større for den upolare stasjonærfasen enn mobil fase, og vil retarderes til denne i større grad enn det opprinnelige ionpar [8].

Det vil i mange tilfeller være hensiktsmessig å benytte en intern standard (IS) i analysen. Den har til oppgave å korrigere for tap ved prøveopparbeidelsen, forandringer i injisert volum og forandringer under kromatografisk analyse

Intern standard må derfor tilsettes prøveløsningen i en kjent mengde. For at et stoff skal kunne benyttes som intern standard stilles det visse kriterier til stoffet. Det må være separert fra andre stoffer i prøven, retensjonstidene til analytt og IS bør ligge i nærheten av hverandre, fysiske egenskaper bør være mest mulig like analyttens, konsentrasjonen bør gi lik topphøyde eller areal for de to stoffene, det må ikke være tilstede i prøven og det må være stabilt og i tilgjengelig i ren form [8].

3.3.3. Deteksjon

Detektoren som brukes i denne oppgaven er en fluorescens detektor. Den er selektiv ved at den kun detekterer naturlig fluorescerende forbindelser eller forbindelser som lett lar seg derivatisere til fluorescerende produkter. Disse strukturene inneholder delokaliserte π -elektroner som lett kan eksiteres til ikke-bindende energetisk lavtliggende singlet tilstander ($\pi \rightarrow \pi^*$). Forbindelser som lar seg fluorescere er aromatiske, da først og fremst polysykliske aromater, og enkelte andre systemer med mange konjugerte dobbeltbindinger. Substituenten som NH_2 , NR_2 og OH øker graden av fluorescens, mens elektrontiltrekkende grupper som NO_2 , COOH , NHCOR , NR_3^+ , Cl , Br og I reduserer den delvis eller fullstendig [8].

3.4. Cytomegalovirus

3.4.1. Cytomegalovirus-infeksjon

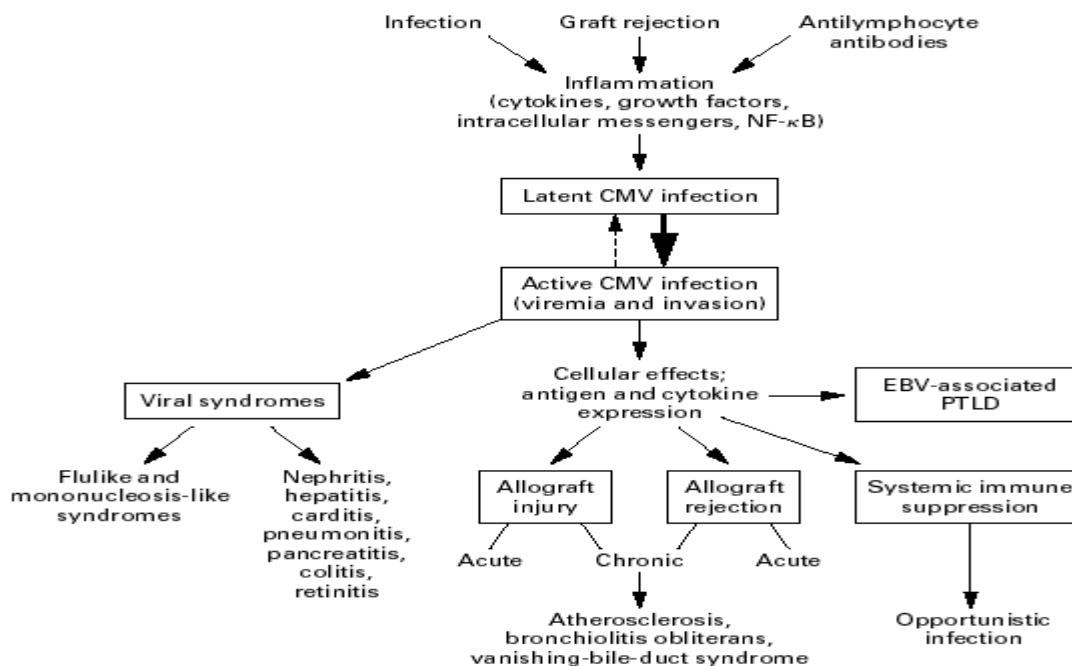
Flertallet av alle mennesker er infisert med cytomegalovirus (CMV), men infeksjonen videreutvikles til klinisk sykdom kun hos immunsuppresserte pasienter, slik som nyretransplanterte og AIDS-syke. Viruset tilhører herpesgruppen, og kan i likhet med andre herpesvirus ligge latent i kroppen. Smitte skjer via intim kontakt med virus-inneholdende sekreter, for eksempel spytt, urin, brystmelk, vaginalt sekret eller et transplantert organ [9].

Det er vist at mer enn 60 % av organtransplanterte utvikler en aktiv CMV-infeksjon, og at mer enn 20 % av disse er assosiert med kliniske symptomer i tillegg [10]. CMV-infeksjon oppstår normalt mellom første og fjerde måned etter transplantasjonen hvis ikke profylaktisk

eller pre-emptive behandling blir gitt [11]. Aktivering av latensiteten kan skyldes flere faktorer; bl.a. behandling med antilymfocyt antistoff og cytotoksiske legemidler, akutte reaksjonsepisoder og systemisk infeksjon eller inflammasjon. Bruk av antilymfocytglobulinet ALA mot steroidresistent reaksjon øker risikoen for å utvikle CMV-sykdom med mer enn 60 % [9]. Frigjøring av TNF og andre proinflammatoriske cytokiner stimulerer forskjellige intracellulære messengere til å reaktivere CMV fra latensitet og resulterer dermed i viral replikasjon. Kroppens cytotoksiske T-lymfocytter prøver normalt og bekjempe viruset, men undertrykkes av immunosuppressive legemidler som ciklosporin, tacrolimus og kortikosteroider. Risiko for utvikling av infeksjon er derfor stor hos pasienter som står på slike legemidler.

Direkte akutte effekter av CMV i transplanterte mottagere er blant andre feber og myalgi, leukopeni eller trombocytopeni, lungebetennelse, infeksjon i organtransplantatet (hepatitt, pneumonitt, nefritt, myocarditt, pankreatitt eller encefalitt) og infeksjon av nærliggende vev (retina, gastrointestinal trakt og pankreas). Ofte er infeksjonen i tilknyttet det transplanterte organet; CMV-hepatitt er vanlig etter levertransplantasjon, pneumonitt etter lungetransplantasjon osv. Indirekte effekter, både akutte og kroniske, er blant andre reaksjon eller skade på transplantatet, bakteriell superinfeksjon (lungene), superinfeksjon pga immunosuppresjon, lymfoproliferativ sykdom som følge av Epstein- Barr virus, glomerulopati hos nyretransplanterte og toksiske effekter av behandlingen (figur 5). Igjen ses det en sammenheng med infeksjon og transplantat; sykdom i kransarteriene og bronkiolitt etter henholdsvis hjerte- og lungetransplantasjon. Det er også svært vanlig å utvikle soppinfeksjoner [9, 12].

Andre effekter av CMV er at veksten av humane benmargskoloniserende celler blir hemmet, og at viruset utøver en rekke immunologiske effekter som fremmer hemming av immunresponsen knyttet til CMV-infeksjon og/eller transplantatreaksjon. Det skjer en reduksjon i T-celle proliferasjon, frigjøring av interleukin-2 reseptorer til serum, hemming av CMV-indusert oppregulering av antigen, samt immunosuppresjon i organtransplanterte med en aktiv CMV-infeksjon [11].



Figur 5. Rollen av CMV-infeksjon i transplanterte mottagere. Systemiske inflammasjonsmediatorer kobler CMV-infeksjon til skade og reaksjon på allograftet, til infeksjon med opportunistiske patogener, og til utviklingen av kreft i organtransplanterte mottagere. EBV står for Epstein Barr virus, og PTLD står for post-transplantation lymphoproliferative disease [12].

CMV kan forårsake sykdom eller infeksjon. CMV-sykdom beskrives som infeksjon med symptomer eller vevsinvasjon, og deles inn i CMV-syndrom og vevsødeleggende sykdom. CMV-syndrom defineres som aktiv viremi i tillegg til feber med eller uten leukopeni og trombocytopeni. CMV-infeksjon defineres som viremi uten symptomer [13]. Det skilles også på en primær infeksjon hvor mottageren blir eksponert for viruset for første gang, og sekundær infeksjon (reakivering) som oppstår i seropositive mottagere [14].

3.4.2 Risikofaktorer

Risikoen for å utvikle direkte eller indirekte CMV-relaterte problemer er avhengig av hvilket organ som er transplantert. Tarm-, lunge- og pankreas-transplanterte blir definert som høyest risiko, lever- og hjerte-transplanterte moderat risiko, mens nyretransplanterte har den laveste risikoen for å utvikle sykdom. Serostatus og antistoffbehandling er uavhengige risikofaktorer som ikke kan knyttes direkte til organene [9].

Pasientene har høy risiko for å utvikle CMV-sykdom dersom de er seronegative, og samtidig mottar et organ fra en seropositiv donor (D+/M-) [14]. Det er vist at mer enn 50 % risiko for å

utvikle symptomatisk sykdom dersom pasienten har denne kombinasjonen [12]. Forekomsten av seropositivitet øker med økende alder [9]. Dersom CMV-replikasjon oppstår i disse pasientene er det forventet at viral load er høyere her enn hos reaktiverte pasienter med replikasjon [15].

Seropositive mottagere kan også utvikle CMV-infeksjon enten via reaktivering av deres eget latente virus, eller ved overføring av en annen stamme fra donororganet. Dersom en seropositiv mottager har en steroidresistent akutt reaksjon, og blir behandlet med et antilymfocyttemiddel som for eksempel OKT3 eller ATG, vil dette være en høy risiko for utvikling av infeksjonen. Antilymfocytte antistoffer blir også brukt som induksjonsterapi umiddelbart etter transplantasjon, men risikoen for å utvikle infeksjon er ikke like høy for disse pasientene som den er for de med akutt reaksjon. I en studie av nyretransplanterte viste risikoen for CMV-sykdom seg å være 64 % mot 24 % for henholdsvis reaksjon og induksjonsterapi [16]. Det tyder på at denne forskjellen skyldes graden av immunsuppresjon, pasientene som får induksjonsterapi er utsatt for mindre suppresjon enn de med reaksjonsterapi. Forskjellen kan også være relatert til cytokinfrigjøringen som oppstår ved organreaksjon, noe som kan spille en rolle ved reaktiveringen av CMV-latensitet [17].

Mottagere som er seronegative og mottar et organ fra en seronegativ donor (D-/M-) er karakterisert som lav-risiko pasienter og får sjelden CMV-sykdom det første året etter transplantasjon. De kan derimot utvikle infeksjon etter smitte fra befolkningen eller ved overføring av blod som inneholder viruset [14].

3.4.3. Strategier for å hindre CMV-sykdom

Det finnes fire forskjellige strategier for å hindre eller behandle CMV-sykdom hos immunsuppresserte pasienter, og det er viktig å oppnå best mulig rate mellom risiko og fordel. De forskjellige metodene defineres som følgende [9]:

- Profylakse: administrering av et regime til hele populasjonen eller til den delen av populasjonen som innehar høyest risiko for utvikling av infeksjonen. Behandlingen begynner kort tid før eller kort tid etter transplantasjonen og fortsetter ut en på forhånd definert høy-risiko periode, vanligvis 100 dager.
- Pre-emptive profylakse: administrering av et regime gjennom en periode hvor det er forventet at viral replikasjon og sykdom finner sted i majoriteten av pasientene.

- Post-exposure profylakse: administrering av et regime til ett bestemt individ kort tid etter eksponering til en aktiv smittekilde av infeksjonen, for å forhindre sykdom.
- Pre-emptive terapi: administrering av et regime som begynner straks det er laboratoriebevis på en aktiv infeksjon (viral replikasjon), men før kliniske symptomer eller tegn på sykdom har oppstått, for å forhindre progresjon av sykdom.

Det diskuteres stadig hva som er det beste regime av profylakse eller pre-emptive terapi [9]. Forebyggende strategier har ført til at det har oppstått et nytt klinisk syndrom, ”sent oppstått” CMV-sykdom. Dette kan i noen tilfeller skyldes infeksjon med legemiddelresistente mutante virus. Kliniske studier hevder at antivirale legemidler kun forsinker innsettingen av CMV-sykdom i stedet for forhindring av den [18]. Pre-emptive terapi er assosiert med færre episoder med ”sent oppstått” CMV-sykdom, lavere legemiddelrelaterte kostnader og sannsynligvis en lavere risiko for å utvikle infeksjon med virus som er resistente mot ganciklovir (GCV) [19, 20]. Den største ulempen med pre-emptive terapi er at det kreves hyppig blodprøvetakning for å stadfeste tidspunktet for når medisinerings skal starte [20].

3.4.4 Strategier for behandling av CMV-sykdom

Det finnes to strategier for behandling av CMV-sykdom:

- Deferred terapi: behandling starter først når pasienten har kliniske symptomer på sykdom.
- Når forebyggende tiltak ikke har hatt ønsket virkning.

Standard behandling av CMV-sykdom er intravenøs ganciklovir. Tidligere ble det også benyttet oral GCV, men på grunn av dårlig biotilgjengelighet er det mindre brukt ved nåværende tidspunkt.

3.5. Ganciklovir/Valganciklovir

3.5.1. Farmakodynamikk

Ganciklovir (GCV) er et antiviralt middel; en DNA polymerase-hemmer effektiv mot Herpesvirusene. Legemidlet er en asyklisk analog av guanosin. Viral protein kinase UL 97, en tymidin kinase, danner et monofosfat i CMV-infiserte celler, hvilket er det hastighetsbestemmende trinnet for aktivering av GCV, og vertscellenes egne kinaser, som er induert ved CMV-infeksjon, konverterer monofosfatet til et trifosfat (aktivt legemiddel). Det

er på denne formen molekylet konkurrerer med deoksyguanosin trifosfat (dGTP) om å bli substrat for viral DNA polymerase, UL54. Dette fører til en undertrykkelse av viral DNA-replikasjon via påvirkning av genekspressjon og proteinsyntese av viruset (figur 6) [9, 11].

Tidligere standard administrering av GCV hos organtransplanterte har vært intravenøs, noe som har vist seg å være effektivt både for forebygging og behandling av CMV-infeksjon og sykdom. Etter dette er det oftere gått over til oral administrering av GCV for profylakse [21]. I dag administrerer de intravenøs GCV til behandling av sykdom ved Rikshospitalet. Som pre-emptive behandling og profylakse til høyrisiko pasienter (D+/M-) administreres det oral VGCV. I en pågående studie, VICTOR (kap. 3.7) testes det ut om også VGCV er hensiktsmessig til behandling av sykdom. Frem til dette tidspunkt ser resultatene lovende ut, og det tyder på at oral VGCV kan bli standard terapi i nær fremtid.

3.5.2. Farmakokinetikk

VGCV er et prodrug til GCV (figur 7), inneholdende en valyl ester, og blir raskt omdannet til GCV i intestinalveggen og lever etter absorpsjon fra den gastrointestinale trakten [11].

Oral GCV har svært dårlig biotilgjengelighet, mellom 5 og 9 % er vist i studier av organtransplanterte [22-25]. Den absolutte biotilgjengelighet av GCV ved oral administrasjon av VGCV er ca 10 ganger høyere enn for GCV gitt oralt, 60,9 % mot 5, 6 % [24].

Siden VGCV blir raskt hydrolysert til GCV etter absorpsjon, vil den systemiske eksponeringen av prodrug være liten. Det er vist at gjennomsnittelig plasmakonsentrasjon for oral VGCV over 24 timer (C_{AV}) tilsvarer 1-3 % av oral GCV [11, 26]. Systemisk eksponering av 900 mg oral VGCV tilsvarer eksponeringen etter 5 mg/kg GCV gitt intravenøst. 450 mg oral VGCV en gang daglig (QD) tilsvarer 1000 mg oral GCV tre ganger daglig (TID) [26].

GCV er minimalt bundet til plasmaproteiner, kun 1-2 % i et konsentrasjonsområde fra 0,5 til 51 mg/L. Siden VGCV omdannes så raskt til GCV har det ikke blitt bestemt proteinbindingsgraden til denne. Etter intravenøs administrering av GCV blir legemidlet i stor grad distribuert ut i kroppen, inkludert i den intraokulære væsken og cerebrospinalvæsken [27]. GCV skilles utelukkende ut via urinen, hovedsakelig via glomerulær filtrasjon og aktiv

tubulær sekresjon. Hos pasienter med normal nyrefunksjon er halveringstiden mellom 2,5 og 4,5 timer eller mellom 4 og 5,7 timer etter henholdsvis intravenøs og oral administrering. Halveringstiden ($t_{1/2}$) til VGCV har vist seg å være mindre enn 30 minutter [28]. Renal CL synker og $t_{1/2}$ øker hos pasienter med nedsatt nyrefunksjon [27].

Systemisk CL har blitt vist å være 3,6 mL/min per kg kroppsvekt hos pasienter etter administrering av 5 mg/kg intravenøs GCV [29]. Siden hovedutskillelsesvei for GCV er renal er det derfor nødvendig med en dosejustering hos pasienter med nedsatt nyrefunksjon.

Vd til GCV etter oral administrering av 900 mg VGCV viste seg å være 134 L hos CMV- og HIV-seropositive pasienter (n=8) mot 121 L hos friske frivillige (n=12) [30].

Administrasjon av VGCV sammen med ett fettrikt måltid øker eksponeringen av GCV sammenlignet med administrasjon i faste-tilstand, uten signifikant forlengelse av tid (t_{max}) til maks plasmakonsentrasjon (C_{max}). I en randomisert studie med 16 CMV- og HIV-seropositive pasienter som sto på et 3-dagers regime med oral VGCV 450 mg og 875 mg en gang daglig, var gjennomsnittelig AUC_{0-24} for GCV henholdsvis 24 % og 30 % høyere når legemidlet ble gitt sammen med mat enn når det ble gitt på fastende mage. Gjennomsnittlig C_{max} for GCV økte med henholdsvis 6 % og 14 %, men her var forskjellene ikke statistisk signifikante, t_{max} var 1,5 time etter administrasjon av 875 mg VGCV både med og uten mat [28].

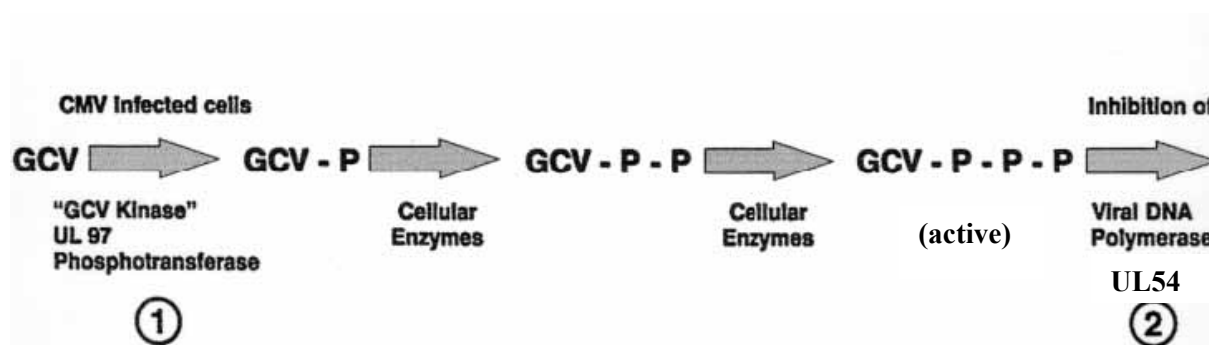
VGCV blir, i motsetning til GCV, absorbert via de intestinale peptid transportørene PEPT1 og PEPT2. PEPT1 transporterer små peptider i tarmen, mens PEPT2 finnes i nyrene. For å øke oral biotilgjengelighet hos legemidler kan det derfor være hensiktsmessig å syntetisere et prodrug med en esterbinding som blir tatt opp av PEPT1. Dersom noe av legemidlet forblir uforandret etter opptak av PEPT1, kan PEPT2 føre til reopptak fra glomerulærfiltratet og dermed forhindre tap av legemiddel via urinen. Her finnes for øvrig også et stort antall esteraser som kan spalte prodrug til aktiv substans [31]. PEPT2 kan derfor påvirke CL av et legemiddel.

3.5.3. Viral resistens mot GCV

Viral resistens mot GCV er et problem som i senere år har økt i omfang [32]. I mer enn 90 % av tilfellene [32] skyldes resistensen mutasjoner eller deleasjoner i genet som koder for UL97,

proteinkinasen som er ansvarlig for fosforyleringen av GCV til GCV monofosfat [33]. Mutasjonene finner i mer enn 80-85 % sted ved kodon 460, 520 eller i området mellom 590 og 607 [15]. Graden av resistens vil kunne variere siden mutasjoner kan skje så mange steder i genet [32]. Dette gir en GCV-spesifikk resistens.

Resistens kan også oppstå fra mutasjoner i det virale DNA-polymerasegenet UL54. Denne mutasjonen ses sjelden alene, den er i de fleste tilfeller assosiert med mutasjon i UL97. I UL54 kan mutasjonene oppstå flere steder i genomet [15]. Det kan oppstå kryssresistens mot andre anti-CMV legemidler, eks cidofovir og foscarnet da de også utøver sin effekt via påvirkning av UL54 (figur 6) [11, 15]. Lokasjonen på mutasjonen bestemmer om den vil være kryssresistent med cidofovir, foscarnet eller begge [15].



Figur 6. GCV resistens. Intracellulær metabolisme av GCV, som viser de to stedene hvor mutasjoner fører til resistens, UL97 og viral DNA-polymerase UL54. Figuren er tilpasset figur i Drew's artikkel [15].

Årsakene til at resistens oppstår kan blant andre være dårlig compliance eller at legemidlet ikke når frem i tilstrekkelig konsentrasjon til det nødvendige vevet. Dersom det gis suboptimale doser eller de antivirale midlene har dårlig biotilgjengelighet ved oral administrasjon, kan dette også føre til resistens [15].

De største risikofaktorene for utvikling av resistens er varighet av legemiddeleksponering, vertens immunkompetanse og mengde og varighet av den pågående virale replikasjonen. Størst er denne risikoen for pasienter som gjennomgår en primær infeksjon (D+/M-), siden viral load er høyere her enn hos andre pasienter [32].

Hovedstrategien for å unngå resistens er å sikre at tilstrekkelig potent anti-CMV aktivitet uten dosebegrensende bivirkninger når frem til målorganet. VGCV har en farmakokinetisk profil

som skulle kunne medføre en systemisk eksponering på linje med intravenøs GCV. Det er derfor forventet at VGCV vil være et bedre alternativ enn oral GCV til undertrykkelse av viral replikasjon. Dette fører til en reduksjon i seleksjon av resistente mutanter. Compliance er viktig for å hindre viral replikasjon, og peroral administrering kan her være gunstigere enn intravenøs. Vertens immunitet bør også optimaliseres, for eksempel ved å unngå overskudd av immunosuppressiva og øke immuniteten ved immunologisk terapi [32]. Behandling i stedet for profylakse kan være fordelaktig for å unngå resistens dersom det benyttes orale legemidler med dårlig biotilgjengelighet i pasienter med fraværende anti-CMV immunitet [15]. Hyppig laboratorietesting er nødvendig for å bestemme om viruset har utviklet legemiddelresistens [32]. Dersom mutante stammer blir påvist bør det enten administreres foscarnet sammen med GCV eller substituere med cidofovir [15].

3.5.4. Bivirkninger

Nøytropeni, trombocytopeni, leukopeni og anemi er vanlige bivirkninger i sirkulasjonen etter eksponering til GCV. Depresjon, angst, hodepine, insomnia, dyspné, diaré, øye- og øresmerter, nedsatt nyrefunksjon, kløe, rygg smerter eller forhøyede leververdier er også sett i mer enn 1 av 100 pasienter [34].

3.6. Dagens monitorering av VGCV/GCV-terapi

Per i dag er det ingen monitorering av plasmakonsentrasjoner av GCV i klinikken. All monitorering baserer seg på måling av viremi. Ved hjelp av plasmakonsentrasjoner kan det settes opp en populasjonsmodell som beskriver farmakokinetikken til de antivirale legemidlene. Denne vil gi informasjon om klinisk effekt, og dermed bidra til å gi fremtidige pasienter mer optimal legemiddelterapi med færre toksiske bivirkninger.

3.7. VICTOR-PK studien

Denne oppgaven er en del av en større studie, Valcyte in CMV-disease treatment of solid organ recipients–pharmacokinetics (VICTOR-PK), som igjen er en substudie av VICTOR. Målet med hovedstudien VICTOR er å evaluere effektivitet og sikkerhet av oral VGCV mot intravenøs GCV for behandling av CMV-sykdom hos organtransplanterte mottagere. Etter 21 dagers behandling med enten oral VGCV eller intravenøs GCV BID får alle pasientene

administrert oral VGCV QD som vedlikeholdsdose i 4 uker. Dosejustering blir gjort med hensyn til den enkelte pasients nyrefunksjon. Plasmaprøver blir samlet under hele perioden, og viremi måles ved hjelp av sentral CMV-PCR analyse.

Målet med substudien VICTOR-PK er å evaluere kinetikken til GCV etter administrasjon av oral VGCV mot intravenøs GCV. Plasmakonsentrasjoner blir målt ved hjelp av HPLC fra de samme plasmaprøvene som blir brukt til PCR-analyse. Inklusjonskriteriene for å bli med i studien er at det må være påvist CMV-sykdom både virologisk og klinisk, uavhengig av tid etter transplantasjon, serostatus og tidligere episoder med anti-CMV terapi eller forebyggende tiltak. Pasientene må også ha fylt 18 år, ha en nyrefunksjon på mer enn 10 mL/min, unngå graviditet og si seg villig til å være med på studien.

3.8. Mål

Hovedmålene med denne oppgaven er å:

- validere en analysemetode for måling av GCV
- analysere pasientprøver for å bestemme plasmakonsentrasjonen ved gitte tidspunkt
- sette opp en populasjonsmodell som beskriver farmakokinetikken til GCV etter administrasjon av intravenøs GCV 5 mg /kg BID til organtransplanterte pasienter.

Ved hjelp av NONMEM vil man først og fremst finne estimerer på CL og Vd, og påvirkningen av disse ut fra kjente kovariater som for eksempel alder, kjønn, nyrefunksjon, vekt, høyde, mengde CMV osv. Ut fra dette vil det være mulig å kunne optimalisere og individualisere doseringen av VGCV, samt gi en pekepinn på om terapeutisk legemiddelmonitorering vil være fornuftig i det enkelte tilfellet. Modellen vil også kunne knytte plasmakonsentrasjonene til effekt og bivirkninger, noe som per i dag ikke har blitt studert.

4. MATERIALE OG METODER

4.1. Kjemikalier

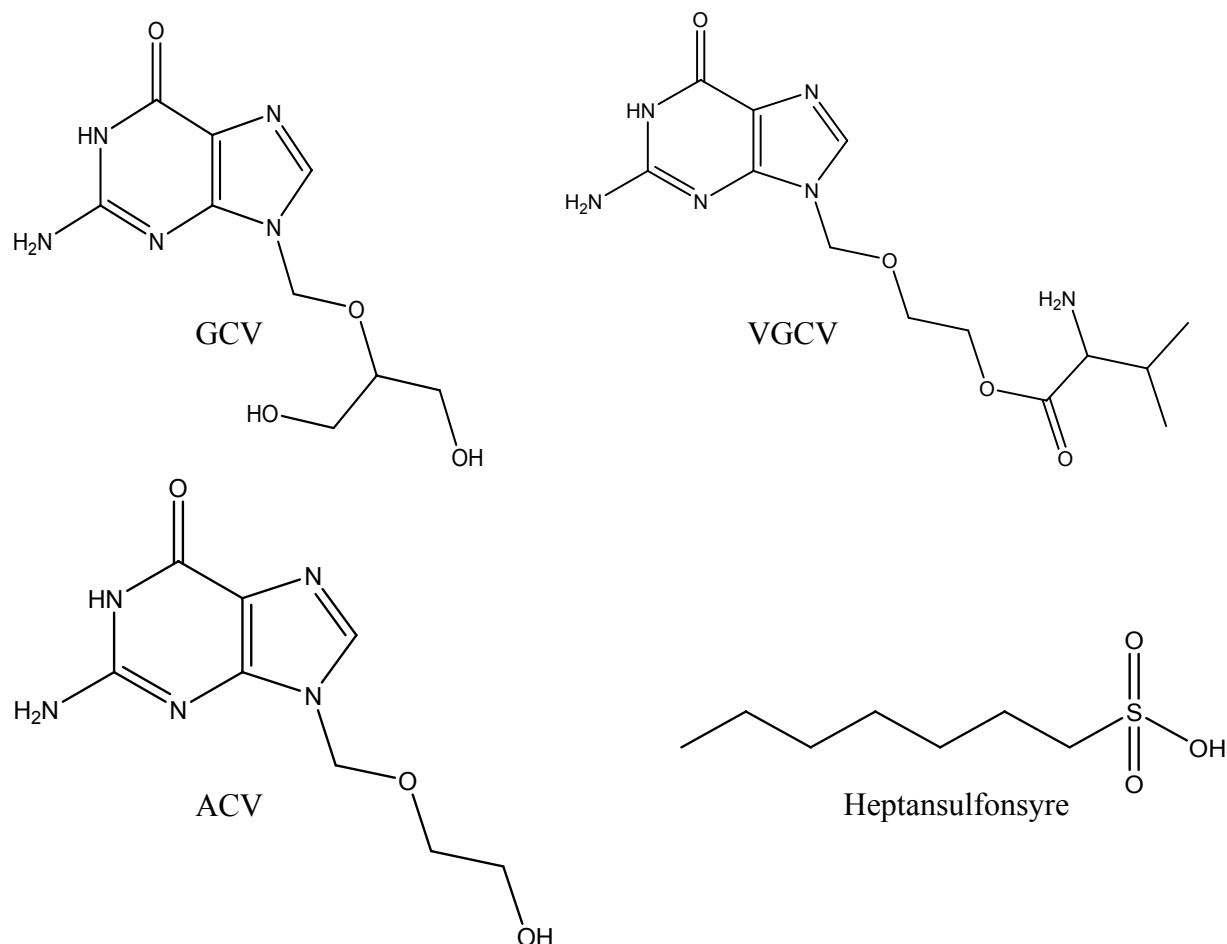
Natriumheptansulfonat	Sigma, USA
Natriumdihydrogenfosfat	Prolabo, Frankrike
Orto-fosforsyre 85 %	Fluka, Sveits
Metanol	Merck, Tyskland
Acetonitril	Merck, Tyskland
Isopropanol	Arcus, Norge
Acykloguanosin	Sigma, Belgia
GCV	Sigma, Israel

4.2. Utstyr

Oasis HLB kolonne (30 mg, 1 mL)	Water Oasis, Irland
SpeedVac Concentrator	ThermoSavant, USA
HPLC-glass	Agilent Technologies, Tyskland
Agilent series 1100 HPLC	Agilent Technologies, Tyskland
Kvartær pumpe	Agilent Technologies, Tyskland
Temperaturkontrollert autoinjektor	Agilent Technologies, Tyskland
Temperaturkontrollert kolonnerom	Agilent Technologies, Tyskland
Fluorescens detektor	Agilent Technologies, Tyskland
Agilent Zorbax [®] Sb-Aq omvendt-fase kolonne (150 x 4,6 mm, 5µm), C18	Agilent Technologies, Tyskland
Guard kolonne	Agilent Technologies, Tyskland
HPLC ChemStation [®] LC3D software	Agilent Technologies, Tyskland
Supelcosil ABZ+plus [™] omvendt fase Kolonne (150 x 4,6mm, 5 µm), C16	Supelco, USA
Minishaker, MS1	IKA, Tyskland
Universal 32 R	Hettich Zentrifugen, Tyskland
Finnpipette	Thermo Scientific, USA
Eppendorfrør 1 mL	Trefflab, Sveits

4.3. Strukturformler og fysikalsk-kjemiske egenskaper

GCV og ACV har både sure og basiske egenskaper (figur 7). Syrens pK_a -verdi er 2,2 for både GCV og ACV, basens pK_a -verdi er på 9,4 og 9,3 for henholdsvis GCV og ACV [35]. VGCV har en pK_a på 7,6 for basegruppen. Stoffene er lett løselige i vann. Heptansulfonsyre er ionisert i hele pH-området.



Figur 7. Strukturformler for GCV, VGCV, ACV og heptansulfonsyre.

4.4. Pasienter og prøvemateriale

Pasientene som ble inkludert i hovedstudien ble også inkludert i denne substudien. Det ble sett til at de to gruppene var omtrent like store. Blodprøvene til de farmakokinetiske studiene, ble samlet samtidig med blodprøvene til hovedstudien, dvs. fra dag 0 til dag 49. De første tre ukene ble det samlet inn prøver to ganger i uken, de siste fire tok man prøver en gang ukentlig. I tillegg ble det, for fire av pasientene samlet inn minst 4 prøver mellom hvert

doseintervall fra før ny dose, 0,75-1,5, 2-5 og 5-9 timer etter ny dose mellom første dose og dag 4, dag 17 og dag 20 og mellom dag 35 og 49.

Blodprøvene ble samlet på nedkjølte EDTA-rør på is og sentrifugert innen 1 time ved 800 g (4 °C) i 20 minutter. Plasma ble så overført til kryorør og lagret ved -20 °C.

Totalt ble det analysert plasmaprøver fra 41 pasienter. For å kunne benytte disse dataene i NONMEM, ble de delt inn i tre grupper. Det ble delt inn i de pasientene som fikk administrert oral VGCV, intravenøs GCV i tillegg til at de fire doseintervall-pasientene dannet en egen gruppe. Demografiske data fra pasientene er vist i tabell 1, 2 og 3.

Tabell 1. Demografiske data for i.v.-gruppen

	n	Nyre- transplantert	Lever- transplantert	Pankreas- transplantert	Lunge- transplantert
Antall pasienter	19	12	2	4	1
Kjønn					
Menn	12	9	2	1	0
Kvinner	7	3	0	3	1
Alder (år) ^a	44,9 (15,4)	47,7 (17,1)	46 (1,4)	32,5 (7,6)	59
Vekt (kg) ^a	64,8 (16,0)	64,2 (15,9)	87 (18,4)	54,5 (3,1)	70
Høyde (cm) ^a	167,3 (11,0)	168,8 (10,6)	179 (1,4)	160,3 (9,7)	155
GFR (mL/min)	50,1 (26,5)	37,3 (14,5)	87,8 (35,3)	67,4 (31,5)	59,2

^a Tallene er gjennomsnittsverdier (standardavvik)

Tabell 2. Demografiske data for p.o.-gruppen

	n	Nyre- transplantert	Lever- transplantert	Pankreas- transplantert	Hjerte- transplantert
Antall pasienter	18	13	2	2	1
Kjønn					
Menn	10	8	1	0	1
Kvinner	8	5	1	2	0
Alder (år) ^a	43,7 (14,3)	42,8 (15,5)	48,5 (10,6)	36 (2,8)	61
Vekt (kg) ^a	64,3 (12,1)	64,3 (12,4)	60 (4,2)	58 (7,1)	85
Høyde (cm) ^a	166,9 (9,1)	167 (9,0)	166 (0)	161 (9,2)	180
GFR (mL/min)	57,3 (22,1)	52,3 (22,9)	78,7 (23,2)	65,8 (7,3)	62,53

a Tallene er gjennomsnittsverdier (standardavvik)

Tabell 3. Demografiske data for doseintervall-gruppen

Kjønn	Transplantat	Administrasjonsvei	Alder (år)	Vekt (kg)	Høyde (cm)	GFR (mL/min)
Mann	Nyre	p.o	54	69,3	169	40,5
Kvinne	Nyre	p.o	39	55	168	55,3
Mann	Nyre	i.v	61	68	164	37,3
Mann	Nyre	i.v	38	93	183	75,0

4.5. Analysemetode [36]

4.5.1. Fast-fase ekstraksjon

Prøveopparbeidelse av plasma var nødvendig for å få til en følsom analysemetode samt fjerne stoffer som kunne ødelegge HPLC-instrumentet. Frosne plasmaprøver ble tint umiddelbart før prøveopparbeidelsen. Fast-fase kolonnene som ble brukt var av typen Oasis HLB. HLB-kolonner inneholder hydrofile og lipofile omvendt fase-sorbenter som kan ekstrahere alle slags stoffer, den vil retardere både hydrofile og lipofile grupper og dermed øke retensjonen

til en del analytter. Kolonnen er robust og blir ikke skadet om den blir tørr mellom hvert trinn i ekstraksjonen.

Stockløsninger av GCV og ACV i vann med konsentrasjon på 1 mg/mL ble tillaget, og deretter fortynnet med plasma til de aktuelle konsentrasjonene i QC-prøver og standardrekker, og med vann til aktuell konsentrasjon i IS.

Prosedyre for ekstraksjonen:

Kolonnene ble kondisjonert med 1 mL metanol etterfulgt av 1 mL vann. 200 μ L plasma ble applisert på kolonnen sammen med 20 μ L intern standard (ACV i vann). Da dette hadde passert kolonnen ble det vasket med 500 μ L vann, før eluering med 750 μ L 10 % metanol i vann. Eluatet ble samlet i eppendorfrør, og løsningen ble dampet inn i Speedvac. 24 prøver tok 1 time og 50 minutter, hvor lampen var tent i 1,5 time. Det inndampede eluatet ble reløst i 200 μ L 5 mmol/L heptansulfonsyre i vann, titrert med fosforsyre til pH 2,1. Prøvene ble knipset på og wortexet slik at alt ble løst. Løsningene ble sentrifugert ved 10 000 g i 10 minutter, og supernatanten ble overført til HPLC-rør.

For å teste om metoden også kan brukes til å bestemme GCV-konsentrasjoner i dialysat og urin, ble samme prøveopparbeidelse gjort med disse matriksene, men ved urin ble det vasket med 1 mL vann før eluering da kromatogrammet viste forurensninger da det ble brukt kun 500 μ L.

4.5.2. Kromatografi

Den kjemiske strukturen til GCV og ACV er svært lik mange endogene substanser, og det var derfor nødvendig å utvikle en selektiv analysemetode for å kunne måle konsentrasjoner av GCV og ACV i plasma. Stoffene inneholder som nevnt grupper som har både svakt sure og svakt basiske egenskaper, og dette ble utnyttet for å separere stoffene i HPLC-systemet. I mobil fase, som har pH 2,1 vil basegruppen til GCV og ACV være ionisert. Analyttene danner ionpar med heptansulfonsyren, som også er ionisert ved pH 2,1. På denne måten blir analyttene gjort mindre hydrofile, og lar seg lettere adsorbere til omvendt fase kolonnen.

HPLC-kolonnen som ble brukt var av typen Agilent Zorbax SB-Aq. For å beskytte denne, ble det brukt en forkolonne, Agilent Zorbax SB-Aq, guardcolumn. Til HPLC-apparatet var det koblet en Fluorescensdetektor med eksitasjon på 265 nm og emisjon på 378 nm.

Før en ny kolonne ble tatt i bruk ble den prekondisjonert med 90 % 10 mmol/L natriumdihydrogenfosfat + 50 mmol/L heptansulfonsyre, pH 2,1, og 10 % acetonitril i 15 minutter med en hastighet på 1 mL/min.

Mobil fase var en isokratisk blanding av 10 % ACN i 50 mmol/L heptansulfonsyre i vann, titrert med fosforsyre til pH 2,1. Hastigheten var 1 mL/min. Injeksjonsvolum på 30 µL, temperaturen var 10 °C i autosamplere og 25 °C i kolonnen. Hver prøve ble analysert i 6 minutter.

Seks av tjuefire prøver i en analyseserie var QC-prøver.

Etter hver 8. prøve ble mobil fase pumpet gjennom systemet i 12 minutter tilsvarende 2 ”blanke prøver”. Etter analyseserien ble kolonnen vasket med ulike konsentrasjoner ACN i 50 mmol/L heptansulfonsyre i vann, med start- og slutt-konsentrasjon på 10 % og gradient økning til 90 %.

Kolonnen ble fjernet fra analyseinstrumentet etter hver dags analyse, og systemet ble spylt med en blanding av vann og isopropanol i varierende konsentrasjoner.

Ved oppbevaring av kolonnen over lengre tid, ble den lagret med 10 % ACN i 50 mmol/L heptansulfonsyre i vann.

4.5.3. Validering av HPLC-analysemetode

Metoden for bestemmelse av GCV i plasma, urin og dialysat ble validert i henhold til retningslinjene for validering av bioanalytiske metoder, gitt av Food and Drug Administration (FDA), USA [37].

Analyseresultatene ble vist både som arealet under kurven (AUC) og topphøyden (TH). En sammenligning av variasjon og nøyaktighet ved AUC og TH ble gjort for å bestemme hvilken av disse to som er det best egnede mål.

Selektivitet

Analysemetodens evne til å separere og kvantifisere analytten ved tilstedeværelse av andre komponenter i prøven sier hvor god selektiviteten er. Blank plasma ble analysert fra 9 pasienter som hadde gjennomgått nyretransplantasjon. De ble ikke behandlet med GCV, VGCV, ACV eller VACV, men pasientene sto på ett eller flere av følgende legemidler vist i tabell 4.

Tabell 4. Legemidler som ble testet for interferens.

Allopurinol	Felodipin	Nifedipin
Amilorid	Fluvastatin	Pantoprazol
Amlodipin	Furosemid	Prednisolon
Acetylsalisylsyre	Hydroklortiazid	Ranitidin
Atorvastatin	Irbesartan	Sirolimus
Kalsitriol	Isosorbid	Spirolakton
Ciklosporin A	Lisinopril	Sulfametoksazol
Darbepoetin alfa	Metoprolol	Tacrolimus
Esomeprazol	Mykofenolatmofetil	Trimetoprim
Everolimus	Nateglinid	

Hver av pasientprøvene ble testet for interferens fra endogene substanser og fra de nevnte legemidlene ved retensjonstidene til henholdsvis GCV og ACV.

Nøyaktighet

Hvor nært analysesvaret ligger en sann verdi blir uttrykt som nøyaktigheten. Plasma fra friske frivillige ble spiket med tre kjente konsentrasjoner innenfor det intervallet hvor det forventes at senere pasientprøver skal ligge (lav, middels og høy konsentrasjon). 6 paralleller fra hver av GCV-konsentrasjonene 0,3, 6 og 24 µg/mL i plasma ble analysert. Gjennomsnittsverdien skal være innenfor 15 % av sann verdi (20 % ved LLOQ).

Presisjon

Parameteren beskriver hvor nært de individuelle målingene ligger til hverandre når prosedyren blir repetert. Tre forskjellige blanke plasma (A, B og C) ble spiket med tre forskjellige konsentrasjoner (0,1, 5 og 40 µg/mL), og det ble analysert fem paralleller av hver, som igjen ble repetert tre ganger på ulike dager. Tre pasientprøver ble også analysert med tre paralleller for å teste presisjonen.

Interdagspresisjonen ble bestemt som gjennomsnitts-CV av de tre repeterte analysene av plasma A, B og C på de tre ulike dagene. Tre paralleller av spiket plasma fra forskjellige konsentrasjonsnivåer og tre pasientprøver ble analysert tre ganger innenfor samme dag. Intradagpresisjonen ble bestemt som gjennomsnitts-CV av de tre analysene. Variasjonskoeffisienten skal ved hver av konsentrasjonene ikke overstige 15 % (20 % ved LLOQ).

Utbytte

Utbyttet sier hvor stor detektor-responsen fra analytten i plasma er sammenlignet med detektor-responsen fra sann konsentrasjon i ren standard. Det trenger ikke være 100 %, men utbyttet av analytt og intern standard må være forenelig, presist og reproduserbart. Analyseresultater for ekstraherte prøver med lav, middels og høy konsentrasjon (0,3, 6 og 24 µg/mL) ble sammenlignet med uekstraherte standarder som representerte 100 % utbytte.

LLOQ

Nedre kvantifiseringsgrense, LLOQ, angir den laveste konsentrasjonen av analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon i den aktuelle analysemetoden. Analyttrespsen ved LLOQ må være minst 5 ganger så stor som responsen til blank prøve, og toppen må være identifiserbar, diskret og reproduserbar med en presisjon på 20 % og nøyaktighet mellom 80 og 120 %.

Standardkurve

Kurven beskriver forholdet mellom instrument-respsen og kjente konsentrasjoner av analytten. Den består av blank prøve, nullprøve og 6-8 prøver med spiket plasma i det konsentrasjonsområdet man forventer at de senere prøvene vil ligge, inkludert LLOQ. Det kan være et maksimalt avvik på 20 % fra nominell konsentrasjon ved LLOQ, og 15 % for de andre nivåene.

QC-prøver

Kvalitetskontrollprøver skal inngå i hver analyseserie for å kontrollere at konsentrasjonene er gode nok. QC-prøvene har kjente konsentrasjoner, og skal inngå som minst 10 % av alle prøvene i en analyseserie. Hvis analyseresultatene fra kontrollprøvene avviker med mer enn 10 %, skal hele analyseserien kjøres på nytt. Det er et krav om at fire av seks QC-prøver skal godkjennes, og at de to som eventuelt faller utenom ikke har samme konsentrasjon.

Linearitet

Ved hjelp av standardkurven kan man bestemme metodens linearitet innenfor et gitt konsentrasjonsområde. Ni konsentrasjoner ble brukt som standardrekke. Regresjonskoeffisienten bør være nært 1,0. Det ble analysert spikede prøver av både plasma, urin og dialysat for å gi standardkurver.

Fortynning

For å teste evnen til å fortynne prøver over den øvre grense av standardkurven, ble det laget en spiket plasmaprøve med konsentrasjon på 60 µg/mL. Denne ble fortynnet med blank plasma til 30 µg/mL, som igjen ble fortynnet ned til 15 µg/mL.

Stabilitet

Etter at prøvene hadde tint, ble de analysert i løpet av to timer. Dette er den samme tidsrammen som ville gjelde under selve studien. Kort-tids temperaturstabilitet ble derfor ikke undersøkt videre utover dette tidsrommet da tidligere studier har bekreftet at det ikke skjer en nedgang i plasmakonsentrasjonen av GCV etter at prøven har stått i romtemperatur i 2 timer [38].

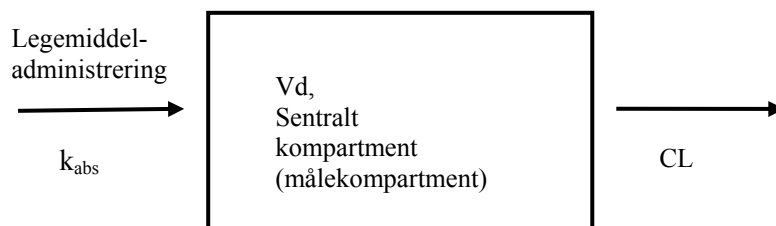
Analytt-stabiliteten ble også testet ved tre fryse-tine sykluser. Tre forskjellige blanke plasma, spiket med kjente mengder GCV, ble analysert ved tre forskjellige anledninger. Prøvene var frosne i minst 24 timer i hver syklus, og måtte tines før analysene.

Postpreparativ stabilitet etter prøveopparbeidelsen ble testet ved å reanalysere prøvene etter en natt i autosampler og opp til 7 uker i kjøleskap ved 4 °C.

Stabilitet etter lang tids lagring har tidligere blitt testet ved å oppbevare GCV ved minimum -20 °C i 20 måneder [39].

4.6. NONMEM

Dataene fra de 41 pasientene ble delt inn i tre grupper, intravenøs-, peroral- og kinetikk-gruppen. Målet var å sette opp en farmakokinetisk modell for den intravenøse gruppen. Det ble i første omgang brukt en én-kompartimentmodell for å gi et estimat på CL og Vd. Det ble antatt at CL av GCV er assosiert med nyrefunksjonen, og GFR ble valgt som et estimat for nyrefunksjonen. Vd ble antatt å være assosiert med kroppsvekten. Modellen besto av parameterne sentralt Vd og CL ut av systemet (figur 8). Blodprøver ble tatt fra det sentrale kompartiment.



Figur 8. Èn-kompartimentmodell. $CL = k_{el} * Vd$

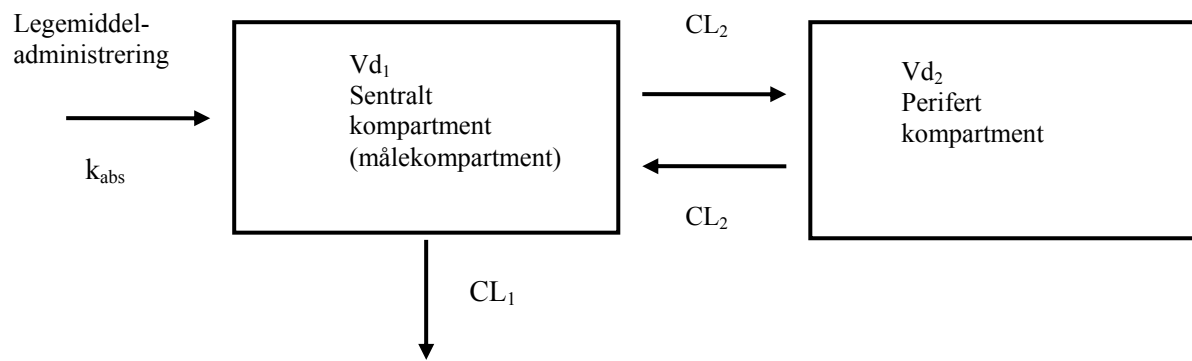

```

$PROB Example to fit a one compartment PK model using differential equations ; states the problem being
      solved
$DATA pasiv5.txt ; the name of the datafile
$INPUT ID DATE TIME AMT RATE MDV CON=DV GFR WT HT
      ; ID=pasient, DATE=day and TIME is given in hours
      ; AMT is the amount of drug administered
      ; RATE is the route of administration, If RATE = 0, then AMT is given as a bolus
      ; CON means concentration and is the dependent variable NONMEM is trying to predict
      ; MDV=Missing Dependent Variable, used to note the drug input line
      ; GFR=glomerular filtration rate, WT=weight, HT=height
$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=3 ; Set up differential equation mode
$MODEL COMP(CENTRAL,DEFDOSE) ; one compartment
$PK ; Define basic PK relationships
      V = THETA(1)*WT*EXP(ETA(1)) ; volume of distribution depends on weight and an interindividual error
      CL = THETA(2)*GFR*EXP(ETA(2)) ; clearance depends on renal function and an interindividual error
      K=CL/V ; micro-rate constant
$DES ; Define differential equations
      DADT = -A*K ; differential equation
$ERROR ; Compute DV from state variables
      Y= A/V * (1+EPS) ; constant coefficient of variation model
$THETA; initial estimates of the parameters of the structural model
      (0, 1, 15) ; V
      (0, .05, 5) ; CL
$OMEGA ; initial estimates of the variance of the interindividual random effects (ETAS)
      .1 .1
$SIGMA ; initial estimates of the variance of the intraindividual random effects (EPSILONS)
      .04
$ESTIMATION SIG=3 MAX=2000 PRINT=1 METHOD=0 ; first order (FO) method, parameters that control
      the estimation process.
$TABLE ID TIME DATE CON V CL Y ; prepare an output table of the results

```

Figur 9. Kontrollfilen. Forklaringer er gitt etter semikolon, og vil ikke registreres av programmet.

Siden den farmakokinetiske kurven til GCV etter intravenøs administrering er bifasisk, ble det deretter brukt en to-kompartment modell. Her ble det antatt at både Vd_1 og Vd_2 var assosiert med kroppsvekt, og at CL_1 (ut av systemet) var assosiert med nyrefunksjonen. CL_2 (mellom sentralt og perifert kompartment) ble antatt å være uavhengig av nyrefunksjonen til pasientene (figur 10). Plasmakonsentrasjon er målt ut ifra det sentrale kompartment.



Figur 10. To-kompartimentmodell. $CL_1 = k_{10} * Vd_1$, $CL_2 = k_{12} * Vd_1 + k_{21} * Vd_2$

Kontrollfilen for to-kompartimentmodellen er bygget opp på samme måte som én-kompartimentmodellen, men det måtte det innføres flere variabler (THETA) og differensialligninger (figur 11). THETA 1-4 representerer Vd og CL.

```

$PROB Example to fit a two compartment PK model using differential equations ; states the problem being
      solved
$DATA pasiv5.txt ; the name of the datafile
$INPUT ID DATE TIME AMT RATE MDV CON=DV GFR WT HT
      ; ID=pasient, DATE=day and TIME is given in hours
      ; AMT is the amount of drug administered
      ; RATE is the route of administration, If RATE = 0, then AMT is given as a bolus
      ; CON means concentration and is the dependent variable NONMEM is trying to predict
      ; MDV=Missing Dependent Variable, used to note the drug input line
      ; GFR=glomerular filtration rate, WT=weight, HT=height
$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=3 ; Set up differential equation mode
$MODEL COMP(Central,Defdose) ; two compartments
      COMP(Peripheral)
$PK ; Define basic PK relationships
V1 = THETA(1)*WT*EXP(ETA(1)) ; central volume of distribution
V2 = THETA(2)*WT*EXP(ETA(2)) ; peripheral volume of distribution
CL1 = THETA(3)*GFR*EXP(ETA(3)) ; intertissue clearance
CL2 = THETA(4)*EXP(ETA(4)) ; intercompartment clearance
K10=CL1/V1 ; micro-rate constant between central compartment and out of the system
K12=CL2/V1 ; micro-rate constant between central and peripheral compartment
K21=CL2/V2 ; micro-rate constant between peripheral and central compartment
$DES ; Define differential equations
DADT(1) = A(2)*K21-A(1)*(K10+K12) ; differential equation, mass transfer in and out of central comp.
DADT(2) = A(1)*K12-A(2)*K21 ; differential equation, mass transfer in and out of peripheral compartment
$ERROR ; Compute DV from state variables
Y= A(1)/V1 * (1+EPS(1)) ; constant coefficient of variation model
$THETA ; initial estimates of the parameters of the structural model
(0, 1, 15) ; V1, bounded below at 0
(0, 1, 15) ; V2
(0, .05, 5) ; CL1
(0, 0.1, 2) ; CL2
$OMEGA ; initial estimates of the variance of the interindividual random effects (ETAS)
.1 .1 .1 .1
$SIGMA ; initial estimates of the variance of the intraindividual random effects (EPSILONS)
.04
$ESTIMATION SIG=3 MAX=2000 PRINT=1 METHOD=0 ; first order (FO) method, parameters that control
      the estimation process
$TABLE ID TIME CON V1 V2 CL1 CL2 Y TIME ; prepare an output table of the results

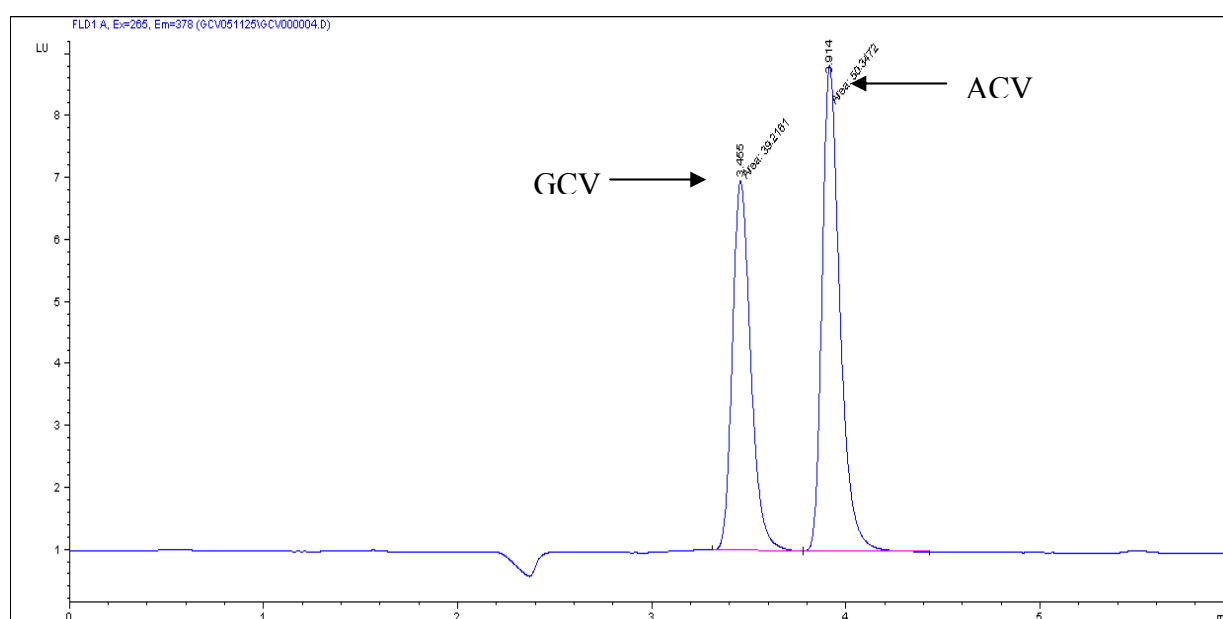
```

Figur 11. Kontrollfilen for to-kompartimentmodellen. Forklaringer er gitt etter semikolon, og vil ikke registreres av programmet.

5. RESULTATER OG DISKUSJON

5.1. Validering

Analysen av GCV og ACV tok i underkant av seks minutter, med retensjonstider på ca 3,45 og 3,91 minutter for henholdsvis GCV og ACV. Toppene viser god grunnlinjeseparasjon, og det er lite forurensninger som blir detektert av fluorescensdetektoren (figur 6).



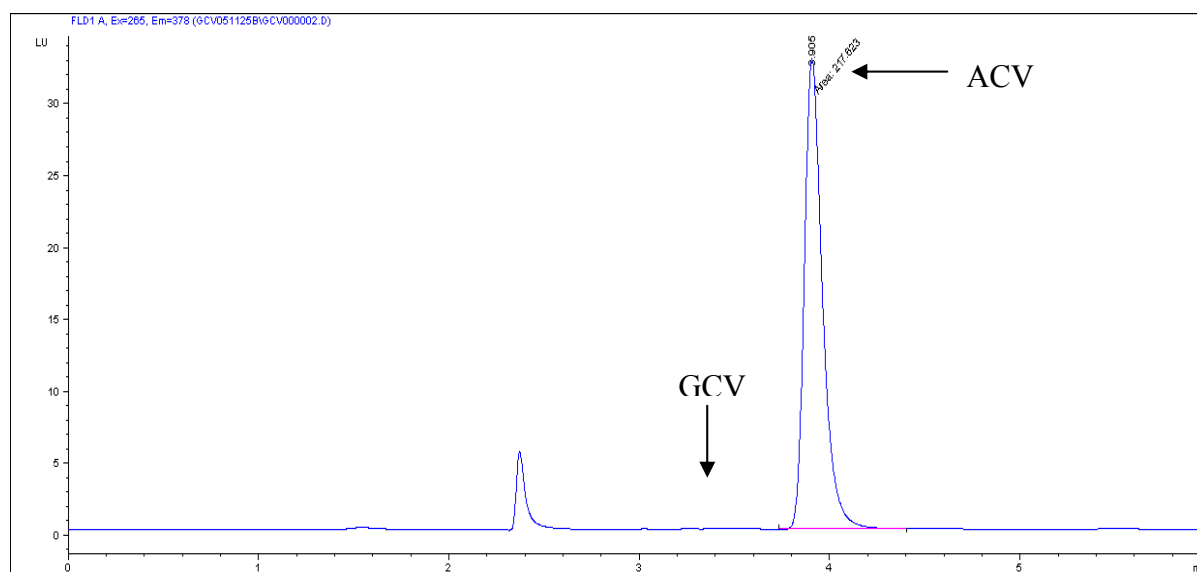
Figur 12. Kromatogram av GCV og ACV renstoff løst i vann.

Topp høyden (TH) viste seg å gi et bedre mål på resultatene enn arealet under kurven (AUC). Denne vurderingen ble gjort ved å sammenligne variasjon og nøyaktighet (tabell 2).

Tabell 5. Sammenligning av variasjon og nøyaktighet for AUC og topphøyden (TH).

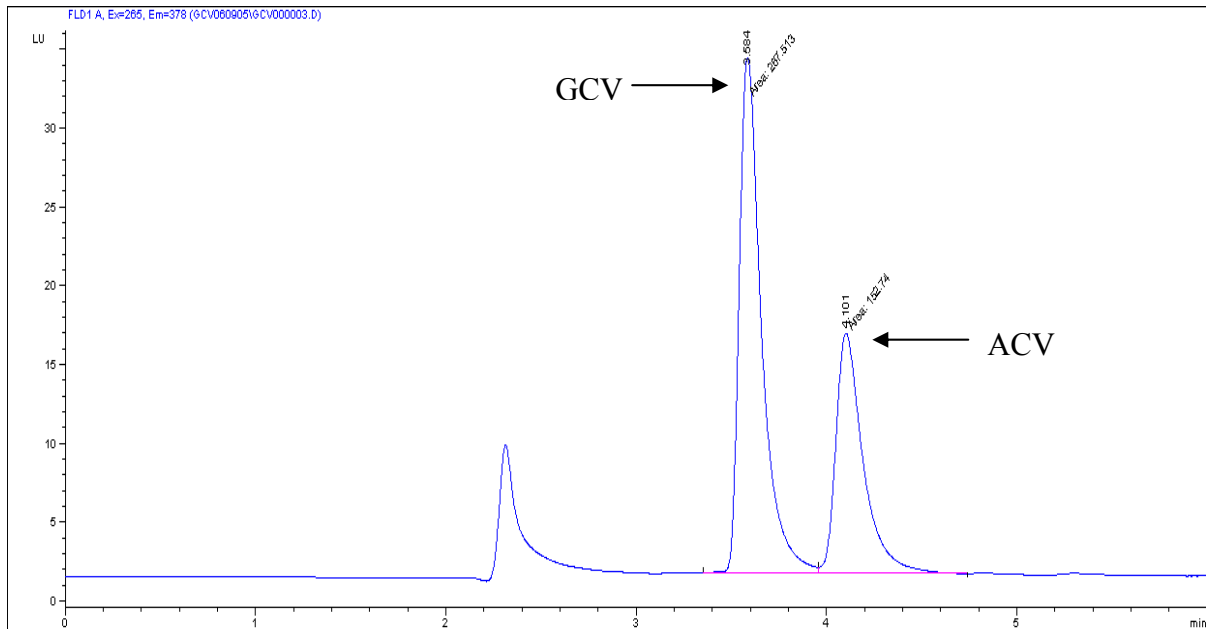
Reell konsentrasjon (µg/mL)	AUC		TH	
	Variasjon (CV %)	Nøyaktighet (%)	Variasjon (CV %)	Nøyaktighet(%)
0,1	15,9	88,5	8,1	105,4
0,5	9,0	78,0	9,0	93,2
1,0	10,3	86,8	6,4	102,4
2,5	7,5	85,9	7,2	99,9
5,0	9,3	80,3	8,0	95,8
10,0	10,6	83,1	10,9	98,5
20,0	10,2	88,1	7,6	104,5
40,0	11,8	80,5	12,1	99,0

Blanke plasmaprøver fra ni nyretransplanterte pasienter viste ingen interferens i analysemetoden (figur 13).

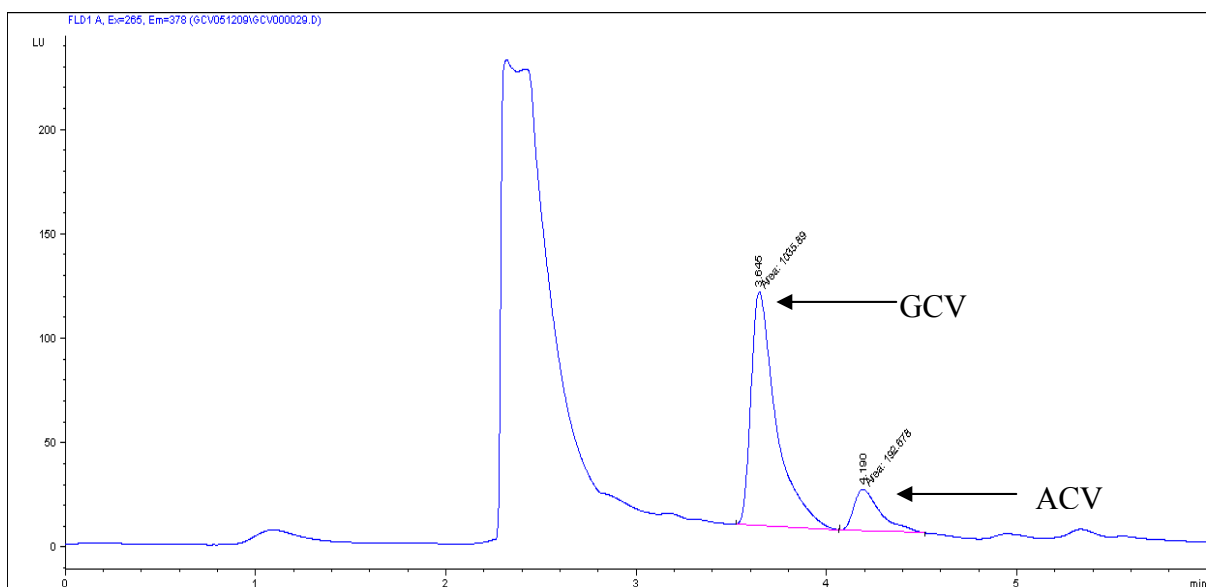
**Figur 13.** Representativt kromatogram av ACV fra en blank plasmaprøve fra en nyretransplantert pasient.

Metoden ble også testet for å se om den kunne brukes til å bestemme plasmakonsentrasjoner av GCV i pasientprøver av urin eller dialysat. Det er lett å skille toppene fra hverandre i

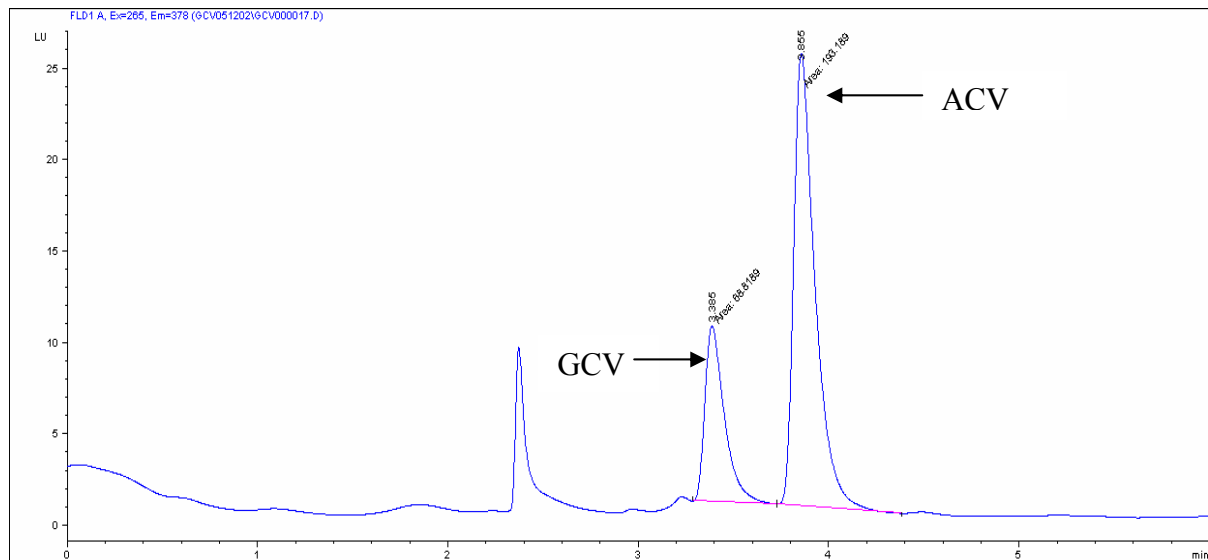
kromatogrammene fra de gitte matriksene, selv om noe mer forurensninger detekteres i urin og dialysat enn i plasma (figur 14, 15 og 16).



Figur 14. Representativt kromatogram av GCV og ACV fra plasma fra en nyretransplantert mottager behandlet med VGCV.



Figur 15. Representativt kromatogram av GCV og ACV fra urin fra en nyretransplantert mottager behandlet med VGCV.



Figur 16. Representativt kromatogram av GCV og ACV fra spiket dialysat fra en pasienter behandlet med PRISMA (kontinuerlig dialyse og filtrasjon) .

Nøyaktigheten ble testet i spiket plasma med nominelle konsentrasjoner på 0,3, 6 og 24 $\mu\text{g/ml}$. Resultatene er vist i tabell 6.

Tabell 6. Nøyaktighet ved kjente konsentrasjoner.

Nominell konsentrasjon ($\mu\text{g/mL}$)	Målt konsentrasjon \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	Relativt avvik (%)
0,3 (n=8)	0,27 \pm 0,01	- 10
6 (n=7)	5,1 \pm 0,44	-14,7
24 (n=8)	20,8 \pm 1,79	- 13,5

Interdagspresisjonen ble målt i spiket plasma A, B og C ved å bestemme variasjonskoeffisienten (CV) for tre analyser av hvert plasma (tabell 7). Intradagspresisjonen ble bestemt som gjennomsnitt-CV i tre paralleller av spikede konsentrasjoner og tre pasientprøver analysert tre ganger i løpet av en dag (tabell 8 og 9).

Tabell 7. Interdagspresisjon (CV %) i tre spikede plasma analysert med tre forskjellige konsentrasjoner på tre forskjellige dager.

Konsentrasjon ($\mu\text{g/mL}$)	CV % Plasma A	CV % Plasma B	CV % Plasma C	CV % Gjennomsnitt \pm SD
0,1 (n=3)	14,0	13,6	10,2	12,6 \pm 2,1
5 (n=3)	5,0	11,9	11,4	9,4 \pm 3,8
40 (n=3)	11,8	12,5	6,3	10,2 \pm 3,4

Tabell 8. Intradagspresisjon (CV %) i tre pasienter.

Pasient	Målt konsentrasjon \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	CV %
1 (n=6)	0,18 \pm 0,04	15,8
2 (n=6)	1,24 \pm 0,08	6,0
3 (n=6)	2,70 \pm 0,35	10,1

Tabell 9. Intradagspresisjon (CV%) i plasma med spikede konsentrasjoner.

Konsentrasjon ($\mu\text{g/mL}$)	Målt konsentrasjon \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	CV %
0,3 (n=6)	0,38 \pm 0,001	3,7
6 (n=6)	6,64 \pm 0,01	1,5
24 (n=6)	27,2 \pm 0,08	3,1

Utbyttet ble bestemt både for GCV og intern standard (ACV). For GCV viste det seg å være $44,4 \pm 4,9 \%$, $47,7 \pm 3,0 \%$ og $48,1 \pm 2,4 \%$ ved henholdsvis 0,3, 6 og 24 $\mu\text{g/mL}$. For ACV ble utbyttet beregnet til å være $46,7 \pm 3,7 \%$.

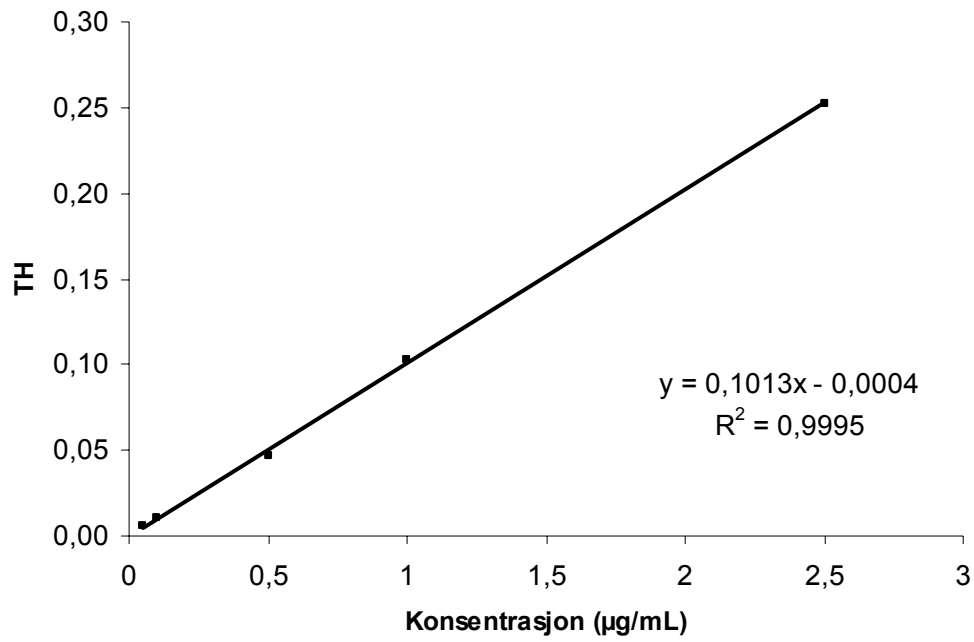
LLOQ ble bestemt til 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Eksakt mengde av spiket plasmaprøve med 0,1 $\mu\text{g/mL}$ viste en gjennomsnittskonsentrasjon på 0,118 $\mu\text{g/mL}$ for 5 paralleller, hvor presisjonen var 2,9 % og nøyaktigheten viste et relativt avvik på 17,5 %. Intensiteten av TH ved LLOQ var minst fem ganger så sterk som intensiteten ved blank prøve.

Standardkurven ligger innenfor de kriterier som stilles av FDA med et maksimalt avvik på 15 % (20 % ved LLOQ), se tabell 10.

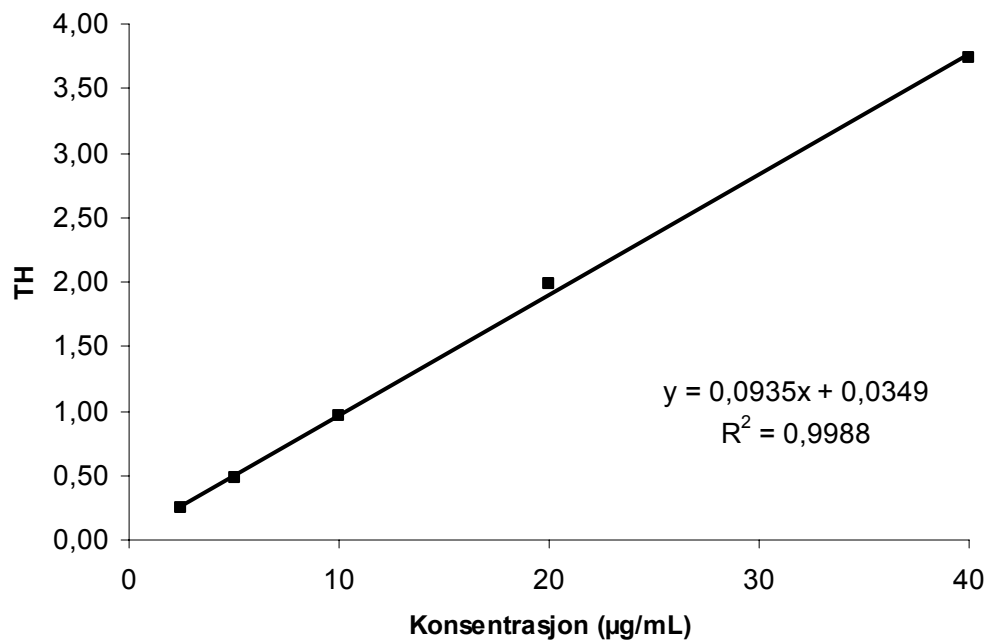
Tabell 10. Nøyaktighet for standardkurven

Nominell konsentrasjon (µg/mL)	Målt konsentrasjon ± STD (µg/mL)	Relativt avvik: (%)	CV %
0,1 (n=5)	0,11 ± 0,01	5,4	8,07
0,5 (n=5)	0,47 ± 0,04	-6,8	9,04
1 (n=5)	1,0 ± 0,07	2,4	6,41
2,5 (n=8)	2,5 ± 0,18	-0,12	7,21
5 (n=5)	4,8 ± 0,41	-4,3	7,96
10 (n=5)	9,8 ± 1,12	-1,6	10,92
20 (n=5)	20,9 ± 1,62	4,5	7,62
40 (n=5)	39,6 ± 4,83	-1,0	12,08

Lineariteten ble bestemt ut fra standardkurven, som ble delt inn i ett område med lave konsentrasjoner og ett med høye konsentrasjoner på grunn av lavere regresjonskoeffisient og bedre nøyaktighet for de målte verdiene sammenlignet med de reelle verdiene. Regresjonskoeffisienten (R^2) for det lave konsentrasjonsområdet var 0,9995, for det høye området var den 0,9988 (figur 17 og 18).

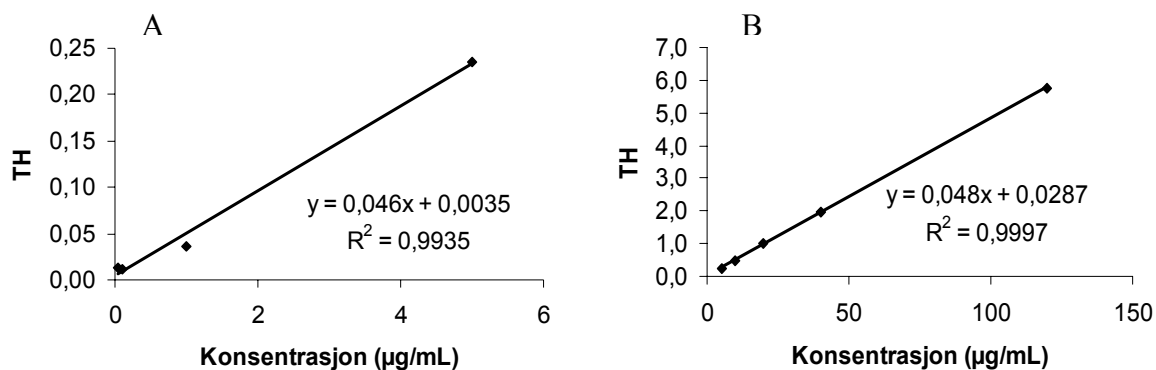


Figur 17. Standardkurve for GCV i plasma med konsentrasjon 0,05 – 2,5 µg/mL



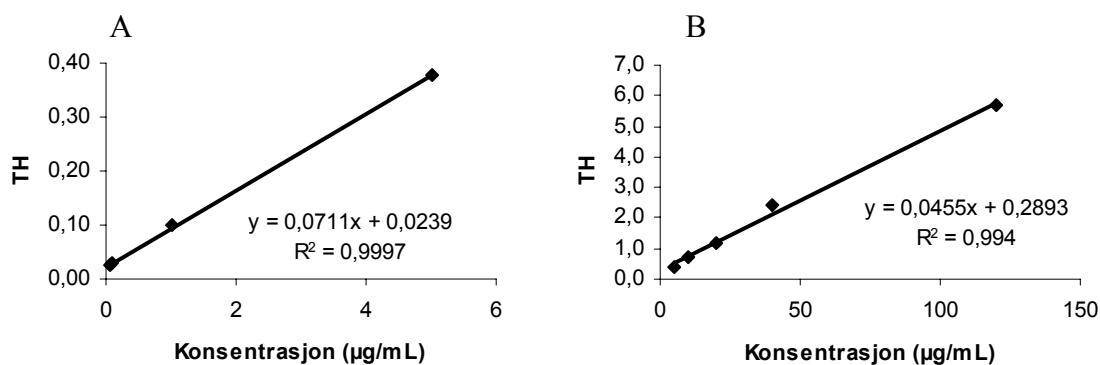
Figur 18. Standardkurve for GCV i plasma med konsentrasjon 2,5 – 40 µg/mL

Standardkurven for GCV i urin med konsentrasjon 0,1 – 120 µg/mL ble også delt inn i et lavt og høyt konsentrasjonsområde (figur 19).



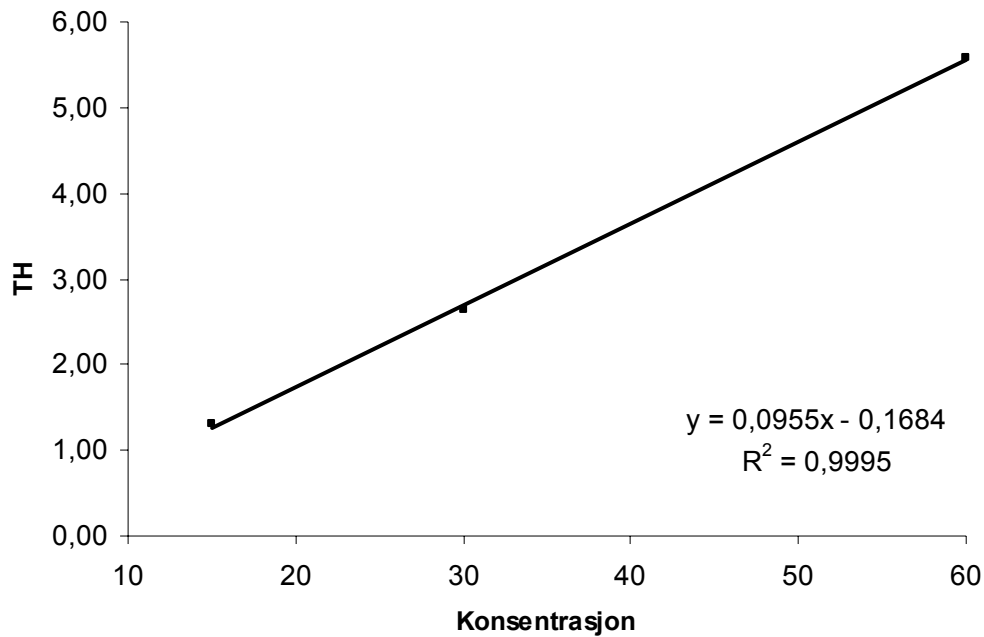
Figur 19. Standardkurver for GCV i urin med konsentrasjonsområde 0-5 µg/mL (A) og 5-120 µg/mL (B).

Standardkurven for GCV i dialysat med konsentrasjon 0,1 – 120 µg/mL ble også delt inn i et lavt og høyt konsentrasjonsområde (figur 20).



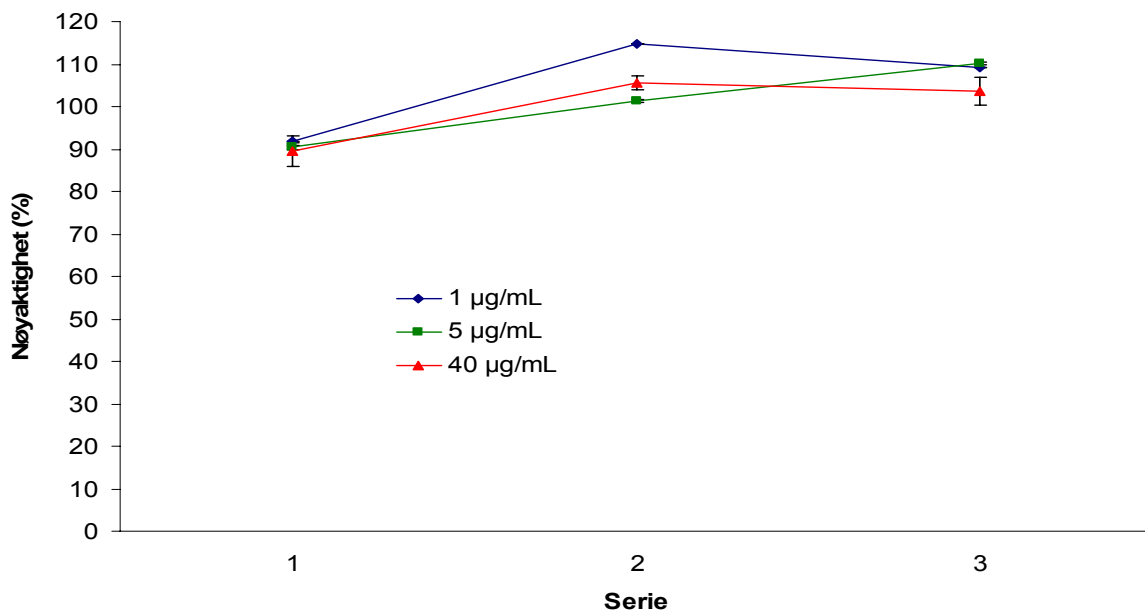
Figur 20. Standardkurve for GCV i dialysat med konsentrasjonsområde 0-5 µg/mL (A) og 5-120 µg/mL (B).

Fortynningsrekken viste at det var mulig å finne konsentrasjoner som ligger over den øvre grensen av standardkurven (ULOQ) (figur 21).



Figur 21. Linearitet for fortynningsrekke fra plasma spiket med 60 μ g/mL GCV.

Stabiliteten er ikke endret etter tre fryse-tine sykluser. Plasma A – C ble analysert tre ganger, hvor de var fryst mellom hver analyse. De viste ingen nedgang i konsentrasjon fra en analyse til neste (figur 22).



Figur 22. Fryse-tine stabilitet. Relativ gjennomsnittsverdi av plasma A-C analysert tre ganger. Error barene viser standardavviket.

Postpreparativ stabilitet ble testet ved å reanalysere prøvene lagret alt fra 1 natt i autosampler til 7 uker i kjøleskap ved 4 °C. Til sammen ble det analysert 10 paralleller per konsentrasjonsnivå. Interdagspresisjonen og relativ konsentrasjonsforskjell er vist i tabell 11.

Tabell 11. Postpreparativ stabilitet etter reanalyser av spiket plasma med forskjellige konsentrasjoner vist som interdagspresisjon og relativ konsentrasjonsforskjell.

Konsentrasjon (µg/mL)	CV %	Relativ konsentrasjonsforskjell (%)
0,1 (n=10)	<20,4	5,5
5 (n=10)	<10,2	0,2
40 (n=10)	<9,8	-0,1

5.2. Analysemetode

Validering av metoden viste resultater som lå innenfor de krav som er gitt [37]. QC-prøver analysert sammen med pasientprøver ga mer varierende resultater. En rekke mindre justeringer ble derfor gjort med både prøveopparbeidelsen og selve analysemetoden. Opprinnelig og endelig prosedyre for fast-fase ekstraksjon og HPLC-metode er vist i tabell 12 og 13.

Kolonnene viste også svært kort levetid, og flere eksperimenter ble gjort for å forlenge denne.

Tabell 12. Prosedyre for henholdsvis opprinnelig og endelig fast-fase ekstraksjon. Tekst i kursiv indikerer forandring.

	Opprinnelig fast-fase ekstraksjon	Endelig fast-fase ekstraksjon
Prekondisjonering:	1 mL MeOH 1 mL vann	1 mL MeOH 1 mL vann
Prøveapplikasjon:	200 µL plasma 10 µL IS (250 µg/mL)	200 µL plasma <i>20 µL IS (50 µg/mL)</i>
Vask:	250 µL vann	<i>500 µL vann</i>
Eluering:	750 µL 10 % MeOH	750 µL 10 % MeOH
Inndamping:	1h50min (lampe tent i 1h30min)	1h50min (lampe tent i 1h30min)
Reløsning:	200 µL 10 mmol/L NaH ₂ PO ₄ + 5 mmol/L heptansulfonsyre. Titrert til pH 2,1 med fosforsyre	<i>200 µL 5 mmol/L heptansulfonsyre + fosforsyre til pH i løsning er 2,1</i>
Sentrifugering:	10 minutter, 10 000 g	10 minutter, 10 000 g

Tabell 13. Prosedyre for henholdsvis opprinnelig og endelig HPLC-metode. Tekst i kursiv indikerer forandring.

	Opprinnelig HPLC-metode	Endelig HPLC-metode
Løsning A:	_____	<i>50 mmol/L heptansulfonsyre i vann</i>
Løsning B:	10 mmol/L NaH ₂ PO ₄ + 50 mmol/L heptansulfonsyre i vann. Løsningen titreres til pH 2,1 med fosforsyre	<i>50 mmol/L heptansulfonsyre i vann. Løsningen titreres til pH 2,1 med fosforsyre</i>
Løsning C:	ACN	ACN
Mobil fase (isokratisk):	90 % B + 10 % C	90 % B + 10 % C
Flow-rate:	1 mL/min	1 mL/min
Injeksjonsvolum:	30 µL	30 µL
Fluorescensdeteksjon:	eksitasjon: 265 nm, emisjon: 378 nm	eksitasjon: 265 nm, emisjon: 378 nm
Kolonnetemperatur:	25 °C	25 °C
Autosamplertemperatur:	10 °C	10 °C
Analysetid:	6 minutter	6 minutter
Vask etter 8 prøver:	Gradient økning av C fra 10 % til 90 % og ned til 10 % igjen. Totalt 20 minutter. 12 minutter mobil fase før neste plasmaprøve.	<i>12 minutter mobilfase.</i>
Kolonnevask etter hver analyseserie:	Gradient økning av C fra 50 % i A opp til 90 %, og tilbake til 50 %.	<i>Gradient økning av C fra 10 % i A opp til 90 %, og tilbake til 10 %.</i>
Lagring av kolonnen:	50 % B + 50 % C	<i>50 % A + 50 % C</i>

5.2.1 Tilbakevendende problemer under analysene

Problemene som stadig dukket opp i analyseprosessen var kolonnens korte levetid og at QC-prøvene ikke ble godkjente i henhold til kravene gitt av FDA om maksimalt 10 % relativt avvik fra nominell konsentrasjon [37]. Gjennomsnittelig levetid for kolonnen var kun 300 plasmaprøver. QC-prøvene lå oftest lavere enn nominell verdi, det vil si med relative avvik større enn -10 %.

5.2.2. Justeringer av opprinnelig analysemetode

Pipettetest

Det ble utført test av pipettene som ble brukt for å avdekke eventuelle feil i oppmåling av volumer. Vekt av pipettert volum av vann og metanol tilsvarte mengdene volum oppmålt.

Forkolonne

Forkolonnen ble skiftet ved trykkøkning. For å hindre at eventuelle forurensninger ble overført til kolonnen, ble forkolonnen tatt av under vaskeprogrammet etter en analyseserie.

Intern standard

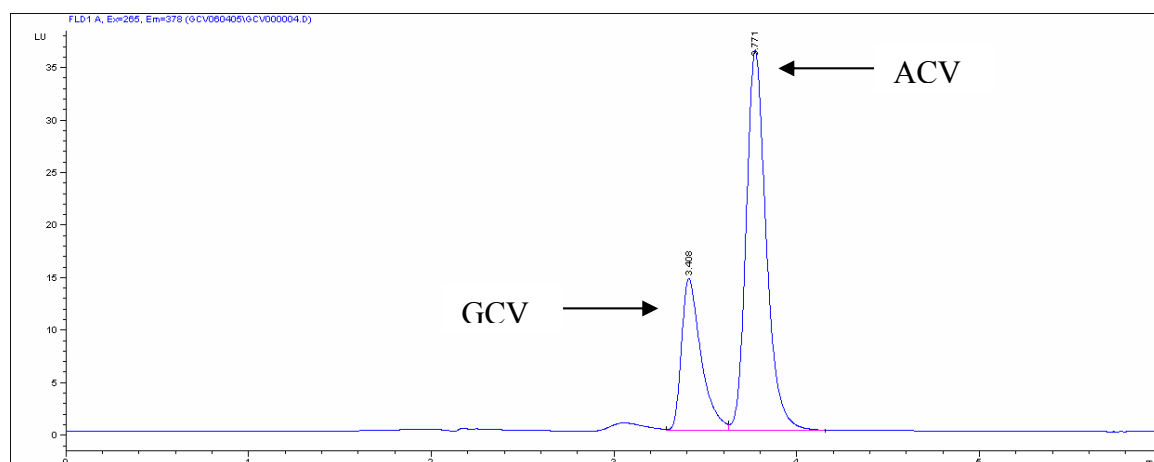
Ved oppmåling av små volum kan det skje overføringsfeil. Stockløsning av intern standard ble derfor fortynt fem ganger, og væskevolumet ble doblet fra 10 μL til 20 μL .

Inndamping

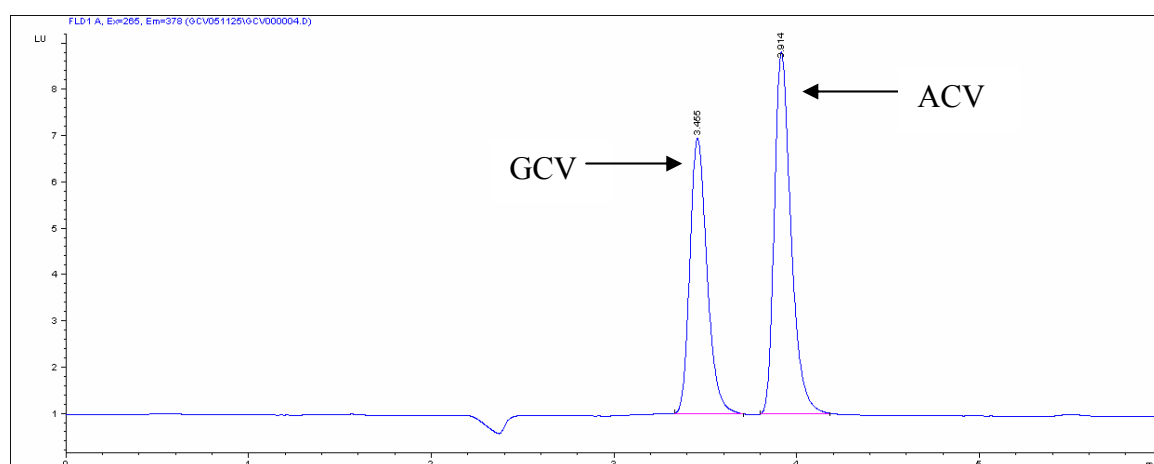
Temperaturen i Speedvac stiger med økende antall prøver. Antallet eppendorfrør ble redusert fra 36 til 24, på grunn av mistanke om at prøvene ble brutt ned ved den høye temperaturen.

Kolonne fra Supelco

Da kolonnen fra Agilent (Zorbax SB-AQ) stadig ga negative resultater og hadde svært kort levetid ble det forsøkt en kolonne fra Supelco (Supelcosil ABZ+ plus). Separasjonsprinsippet, omvendt fase, var det samme for de to kolonnene. Retensjonstider og utseende av toppene med renstoff i vann var sammenlignbare med de to kolonnene (figur 23 og 24).



Figur 23. Representativt kromatogram av GCV og ACV i vann fra ABZ+-kolonnen fra Supelco.



Figur 24. Representativt kromatogram av GCV og ACV i vann fra Zorbax SB-Aq-kolonnen fra Agilent.

Resultatene ble ikke forbedret med den nye kolonnen, og det ble derfor gått tilbake til den opprinnelige kolonnen fra Agilent.

QC-prøver

Opprinnelig ble 1 ml av QC-prøvene og IS lagret i kryorør, og tint og fryst før og etter hver analyseserie. Stabiliteten til stoffene har ikke blitt testet for mer enn tre fryse-tinesykluser, og det ble derfor mistenkt at stabiliteten endres ved økende antall sykluser. QC-prøvene ble deretter lagret ”porsjonsvis” slik at de kun ble tint en gang.

Vaskeprogram

Flere endringer har blitt gjort med hensyn til vask innad i og etter analyseserien. Kolonnen ble plassert både riktig og motsatt vei i vaskeprosessen. Problemet ved å benytte en fosfatbuffer

sammen med ACN i et separasjonssystem er at fosfat kan felle ut i høye konsentrasjoner organisk løsningsmiddel [8].

Det opprinnelige vaskeprogrammet innad i analyseserien ble først endret ved å ikke overstige 50 % ACN, men de negative resultatene vedvarte. For å hindre at fosfat kunne felle ut i kolonnen ble vaskeprogrammet derfor erstattet av gjennomskylling i 12 minutter med mobilfase.

Det opprinnelige vaskeprogrammet ble endret flere ganger underveis. Som vask etter en analyseserie ble varierende konsentrasjoner av vann og isopropanol brukt for å eluere ut eventuelle ”propper” som tettet kolonnen. 30 minutter mobil fase etterfulgt av 10 minutter 10 % ACN i vann ble forsøkt. Det endelige vaskeprogrammet er beskrevet i tabell 13, hvor konsentrasjonen av ACN i vann økes til 90 % over en gradient. Høy konsentrasjon av organisk løsningsmiddel bidrar til at hydrofobe stoffer elueres ut av kolonnen. Dersom det ikke benyttes høye konsentrasjoner av løsningsmiddelet, vil de hydrofobe stoffene ”oppta” seter som analyttene ellers ville ha festet seg til. Dette kan være med på å forklare de negative konsentrasjonsmålingene av QC-prøvene. Fosfat ble kuttet ut for å hindre utfelling i kolonnen.

En gang i uken ble det foretatt en vaskeprosess med lenger varighet og hvor kolonnen ble snudd i en periode. Over helgen ble kolonnen lagret med 10 % ACN i 50 mmol/L heptansulfonsyre i vann.

Mobil fase

Fordi fosfat har dårlig stabilitet ved lagring, ble mobil fase tillaget hver dag. I stedet for å veie inn natriumdihydrogenfosfat, ble fosforsyre tilsatt direkte i vann og heptansulfonsyre til pH 2,1. Nøyaktig konsentrasjon av bufferen er ikke nødvendig å kjenne til, det viktigste er at pH-verdien er nær bufferens pK_a -verdi som er 2,15 ved 25 °C.

Standardkurve

Det tydet på at standardkurven ikke var stabil over lengre tid. Ny standardrekke ble derfor analysert en gang i uken. Etter dette ble alle analyseseriene godkjente, og med de endringer som er beskrevet over ble kolonnens levetid forlenget. I den siste kolonnen som ble brukt økte trykket til over 300 bar i siste analyseserie. Den hadde da analysert over 500 prøver, noe som

viste en lengre levetid enn tidligere. Ved senere analyser bør det undersøkes om kolonnen har bedre levetid dersom mobil fase pumpes kontinuerlig gjennom kolonnen, da det mistenkes at kolonnen ikke tåler lagring over lengre tid.

GCV blir administrert i høye doser, og er presentert i plasma ved høye konsentrasjoner [39]. Injeksjonsvolumet på 30 μL inn i separasjonskolonnen var derfor tilfresstillende da det ikke var viktig å oppnå veldig lave deteksjonsgrenser. Deteksjon og kvantifisering ble gjort ved hjelp av en fluorescensdetektor. Det ble ikke ansett som nødvendig å derivatisere analyttene, da både GCV og ACV har naturlig fluorescerende grupper og lot seg kvantifisere i de konsentrasjonene som var ønskelige i denne oppgaven. Det er vist at fluorescens er økt ved synkende temperaturer og at trykket i kolonnen øker ved temperaturer under 20 °C [40]. En kolonnetemperatur på 25 °C viste god nok sensitivitet.

Erfaringer viser at det etter inndamping i Speedvac kan observeres små korn i eppendorfrørene. Prøvene ble derfor sentrifugert før overføring til HPLC-glass.

Akutt nyresvikt kan føre til svært høye konsentrasjoner av antivirale midler. Den utviklede analysemetoden vil også brukes til PRISMA-pasienter, og er derfor validert for et større konsentrasjonsområde enn det som ofte har blitt gjort tidligere [35, 39, 41].

Separasjonen i HPLC-instrumentet tok 6 minutter, en varighet som er kortere enn hva som er vist tidligere [39, 41-43]. De justeringen som ble utført resulterte i en mer robust metode. Alle analyseseriene ble godkjente med hensyn til at QC-prøvene lå innenfor de gitte krav (kap. 4.5.3). Det ser ut til at problemet med kolonnen løste seg ved de justeringene som ble utført, og derfor vil denne metoden være hensiktsmessig å anvende til bestemmelse av plasma-, urin- og dialysat-konsentrasjoner.

5.3. NONMEM

Modellering med NONMEM er påbegynt, men på grunn av tidsmangel ikke fullført. Resultatene som presenteres i de neste kapitlene vil ikke gi realistiske estimater av de farmakokinetiske parameterne, men modellene kan videreutvikles fra de som vises i denne oppgaven. Det ble kun fokusert på gruppen som fikk administrert intravenøs GCV. Input-filen

over pasientene som fikk oral VGCV er utarbeidet (appendiks), men det er ikke forsøkt modellering av disse dataene.

5.3.1. Én-kompartimentmodell

Modellen med én-kompartimentmodellen ga en verdi av THETA 1 (Vd) lik 2,23 og THETA 2 (CL) lik 1,30.

$$Vd = THETA(1) * WT(gj.snitt) \pm SD$$

$$Vd = 2,23 * 64,8 \pm 2,7 * 10^{-5} = 144,5 \pm 2,7 * 10^{-5}$$

Estimert verdi av Vd er ca. 145 L.

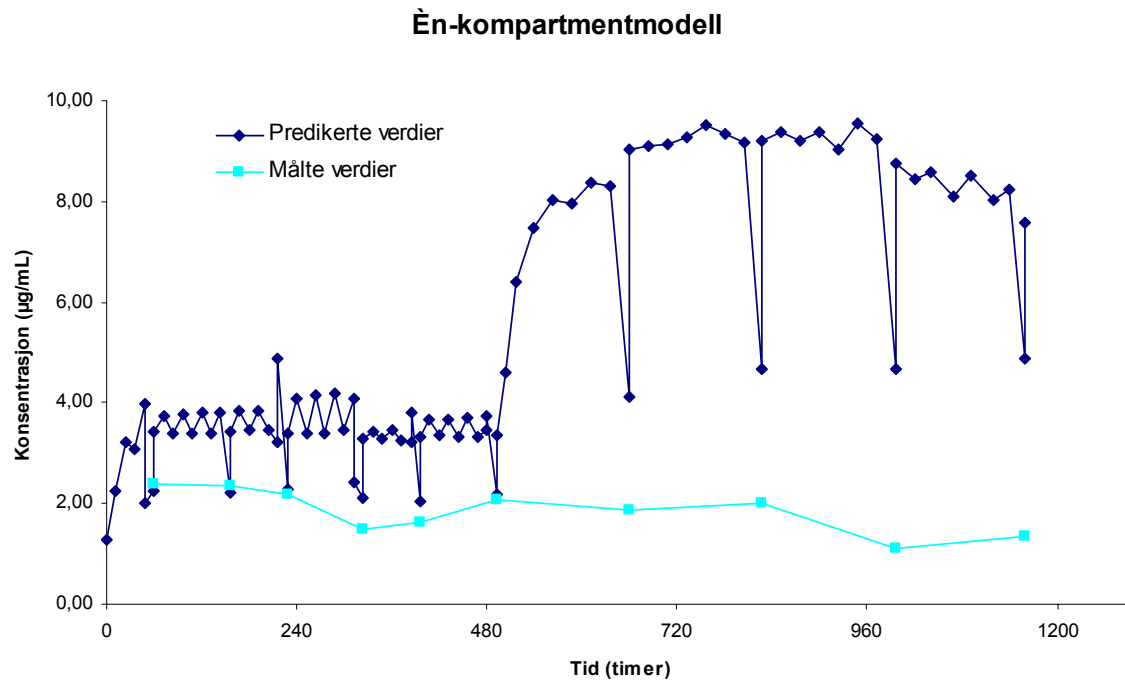
$$CL = THETA(2) * GFR(gj.snitt) \pm SD$$

$$CL = (1,30 * 3,0) \pm 0,54 = 3,9 \pm 0,54$$

Estimert verdi av CL er ca. 3,9 L/time.

Minimum value of objective function (VOF) ble 853. Dette tallet sier noe om hvor godt bilde modellen gir av de observerte dataene. Hvis de predikerte verdiene var identiske med de målte, ville den presenterte modellen være god til å forklare de målte dataene. Lavere verdi av VOF er et mål på en bedre modell. Hvis VOF generelt synker med mer en 3,84 absolutte enheter ved tilføring av en ny parameter eller kompartiment tilsvarer dette en statistisk signifikant forbedring av modellen ($p < 0,05$).

NONMEM predikerer konsentrasjonene ved hver angitte tid i inputfilen, også der det ikke har blitt utført en konsentrasjonsmåling. I denne modellen ble de predikerte verdiene overestimert i forhold til de målte, og det virker som inputfilen ikke leses riktig av NONMEM. Figur 25 viser kurven til de målte og predikerte konsentrasjonene over tid, og sammenligningen av kurvene viser at NONMEM overpredikerer verdiene. Dermed er det ikke reelt å anta at estimatene av THETA 1 og 2 gir et korrekt bilde av farmakokinetikken til GCV.



Figur 25. Grafen sammenligner predikert verdi mot målt verdi i èn-kompartimentmodellen. Det er tatt gjennomsnittet av de 19 pasientene.

5.3.2. To-kompartimentmodell

I en to-kompartimentmodell beregnet NONMEM variablene THETA 1 (Vd_1) til 8,87, THETA 2 (Vd_2) til 0,065, THETA 3 (CL_1) til 2,03 og THETA 4 (CL_2) til 0,01.

$$Vd_1 = \text{THETA}(1) * \text{WT}(\text{gj.snitt}) \pm \text{SD}$$

$$Vd_1 = 8,87 * 64,8 \pm 4,8 = 574,8 \pm 4,8 \text{ L}$$

Estimert verdi av Vd_1 er ca. 575 L.

$$Vd_2 = \text{THETA}(2) * \text{WT}(\text{gj.snitt}) \pm \text{SD}$$

$$Vd_2 = 0,065 * 64,8 \pm 940 = 4,2 \pm 940$$

Estimert verdi av Vd_2 er ca. 4,2 L.

$$CL_1 = \text{THETA}(3) * \text{GFR}(\text{gj.snitt}) \pm \text{SD}$$

$$CL_1 = 2,03 * 3,0 \pm 0,4 = 6,09 \pm 0,4$$

Estimert verdi av CL_1 er 6,09 L/time.

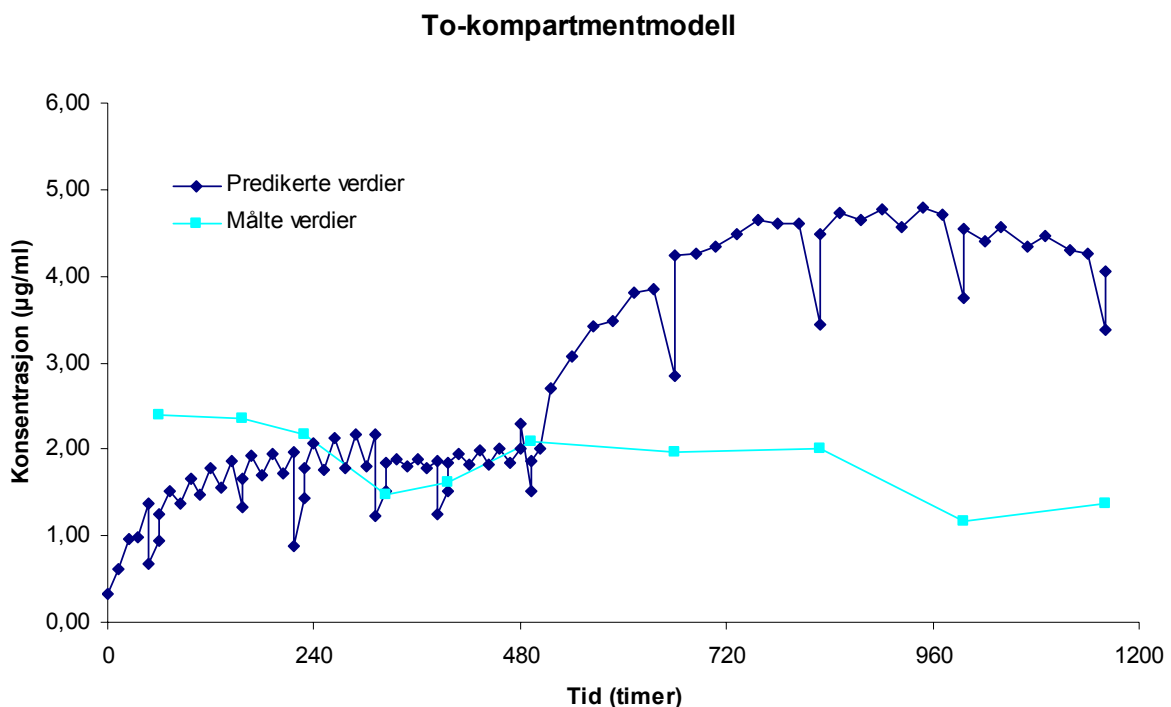
$$CL_2 = \text{THETA}(4) \pm \text{SD}$$

$$CL_2 = 0,01 \pm 1183 = 0,01 \pm 1183$$

Estimert verdi av CL_2 er 0,01 L/time.

VOF ble beregnet til å være 471, noe som tyder på at to-kompartimentmodellen gir en bedre bestemmelse av dataene sammenlignet med én-kompartimentmodellen. Forskjellen er mer 3,84 enheter mellom de to modellene, noe som bekrefter at to-kompartimentmodellen er statistisk signifikant bedre. Siden den farmakokinetiske kurven etter intravenøs administrasjon er bifasisk, var det også forventet at to-kompartimentmodellen ville gi bedre resultater enn én-kompartimentmodellen.

Også i to-kompartimentmodellen har NONMEM overestimert verdiene (figur 26.). Det ble beregnet et sentralt V_d på 575 L. Denne verdien er usannsynlig med tanke på en studie av Wiltshire et al. hvor modellering av GCV etter oral administrering av 1000 mg GCV TID og 900 mg VGCV QD beregnet et sentralt V_d på 25 L [44]. Selv om administrasjonsveien her er intravenøs to ganger daglig (BID), er det forventet at sentralt V_d her har tilsvarende verdi.



Figur 26. Grafen sammenligner predikert verdi mot målt verdi i to-kompartimentmodellen. Det er tatt gjennomsnittet av de 19 pasientene.

Under utviklingen av en farmakokinetisk modell vil det være gunstig å begynne med en enkel modell og gradvis legge til parametere. På denne måten kan estimatene i den enkle modellen benyttes som startestimat i den mer kompliserte. Siden den farmakokinetiske kurven etter intravenøs administrasjon er bifasisk, var det forventet at to-kompartimentmodellen ville gi bedre resultater enn én-kompartimentmodellen. NONMEM beregnet VOF til å være signifikant lavere i to-kompartimentmodellen enn hos én-kompartimentmodellen, men estimatet av Vd var mye høyere og mindre realistisk.

Modellen må videreutvikles for å få en tilfredsstillende beskrivelse av farmakokinetikken til GCV. Antageligvis leser ikke NONMEM inputfilen slik det var tiltenkt. Det kan ses ved at etter dag 21 skjer det en kraftig økning i de predikerte verdiene. Det er ved samme dag pasientene bytter fra administrering to ganger daglig til en gang daglig, og det tyder på at NONMEM ikke får med seg denne endringen. Programmet predikerer verdiene som om pasientene får legemidlet to ganger daglig.

Frem til dag 21 beskriver programmet plasmakonsentrasjonene bedre enn etter dag 21. En økning i estimatene av både CL og Vd ses ved overgangen fra én-kompartimentmodell til to-kompartimentmodell.

Forholdet mellom to- og én-kompartiment for sentralt Vd og CL ut av systemet:

$$\text{Vd: } 575 \text{ L} / 144 \text{ L} = 4 \quad \text{CL: } 6,09 \text{ mg/L} / 3,9 \text{ mg/L} = 1,6$$

Det skjer altså en økning i forholdet mellom Vd og CL i begge modellene, men økningen er mye større for Vd enn for CL. Det er forventet at en økning i Vd gir en økning i CL i modellen. Dette vises også ved overgang fra én- til to-kompartimentmodell. Lavere VOF ved to-kompartimentmodellen tyder på at parametere beskriver dataene bedre. Selv om det matematisk blir bedre, betyr ikke det at det er fysiologisk mer sannsynlig. I dette tilfellet skjer det en feil slik at den mest sannsynlige matematiske modellen ikke er i samsvar med det som er observert.

På bakgrunn av at GCV har minimal proteinbindingsgrad og hovedsakelig skilles ut via nyrene [27], ble Vd assosiert med vekt, og CL med GFR. Kanskje vil BSA gi et bedre estimat av Vd, dette er noe som bør testes ut med modellene. Ved å assosiere CL med GFR vil modellen ta hensyn til pasienter med lav GFR.

Dataene fra doseintervallpasientene og gruppen som fikk administrert GCV oralt er klare til bruk i modellering, det ville være interessant å sammenligne kinetikken til GCV etter intravenøs administrering og oral VGCV. Doseintervallprøvene vil kunne gi et estimat på verdier av CL og Vd som man videre kan lete etter i de to andre gruppene.

6. KONKLUSJON

Det ble utviklet en analysemetode for måling av GCV i plasma, urin og dialysat. Prøveopparbeidelsen besto av fast-fase ekstraksjon på HLB-kolonner, og til selve separasjonen ble det benyttet HPLC med fluorescensdeteksjon. Kolonnen besto av et upolart bæremateriale, og prinsippet bak separasjonen var omvendt fase med mobil fase bestående av 90 % fosfatbuffer pH 2,1 tilsatt heptansulfonsyre som motion og 10 % ACN. Analysetiden var kun 6 minutter.

Valideringen av metoden ga tilfredsstillende resultater. Analyse av pasientprøver viste stadig QC-prøver som lå utenfor de krav som er gitt. Det ble derfor utført mindre justeringer av den opprinnelige analysemetoden, både med hensyn til prøveopparbeidelsen og selve separasjonen for å oppfylle FDA-kravene til en analysemetode også under rutinekjøring. Det bør lages ny standardrekke en gang i uken, og det må passes nøye på at ikke fosfat feller ut i kolonnen under vasking med høye konsentrasjoner av ACN. Slik den endelige metoden fremstår vil den kunne benyttes til konsentrasjonsmåling av GCV i plasma, urin og dialysat.

Populasjonsmodelleringen ved hjelp av NONMEM ble bare så vidt satt i gang. Det er begynt på utarbeidelse av både én-kompartimentmodell og to-kompartimentmodell for GCV gitt intravenøst. Resultatene er ikke gode nok til å godta som de er vist her, men det er et stort potensial til å jobbe videre med dataene og senere kunne beskrive farmakokinetikken til både intravenøs GCV og oral VGCV. Konsentrasjonsmålinger i plasma, urin og dialysat vil også kunne bidra til å beskrive effekt og toksisitet av disse legemidlene.

7. Referanser

1. Brunton LB, Lazo JS, Parker KL: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Eleventh ed, McGraw-Hill Companies, 2001
2. Winter ME: *Basic Clinical Pharmacokinetics*, Fourth ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2004
3. Shargel L, Yu ABC: *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, Fourth ed, McGraw-Hill, 1999
4. Rang HP, Dale, M.M. , Ritter, J.M , Moore, P.K.: *Pharmacology*, Fifth ed, Churchill Livingstone, 2003
5. Aarons L: Population pharmacokinetics. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 30:520-522, 1992
6. Jelliffe R, Schumitzky A, Van Guilder M: Population pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling: parametric and nonparametric methods. *Ther Drug Monit* 22:354-365, 2000
7. Shafer SL: *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis with NONMEM, Basic Concepts*, 2005
8. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen K: *Kromatografi*, Third ed, Universitetsforlaget, 1998
9. Slifkin M, Doron S, Snyderman DR: Viral prophylaxis in organ transplant patients. *Drugs* 64:2763-2792, 2004

10. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, *et al.*: A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation* 70:1166-1174, 2000
11. Cvetkovic RS, Wellington K: Valganciclovir: a review of its use in the management of CMV infection and disease in immunocompromised patients. *Drugs* 65:859-878, 2005
12. Fishman JA, Rubin RH: Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 338:1741-1751, 1998
13. Fellay J, Venetz JP, Aubert JD, *et al.*: Treatment of cytomegalovirus infection or disease in solid organ transplant recipients with valganciclovir. *Transplant Proc* 37:949-951, 2005
14. Kusne S, Shapiro R, Fung J: Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 1:187-203, 1999
15. Drew WL, Paya CV, Emery V: Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals. *Am J Transplant* 1:307-312, 2001
16. Hibberd PL, Tolkoff-Rubin NE, Conti D, *et al.*: Preemptive ganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease in cytomegalovirus antibody-positive renal transplant recipients. A randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 123:18-26, 1995
17. Fietze E, Prosch S, Reinke P, *et al.*: Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* 58:675-680, 1994
18. Razonable RR, Paya CV: Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *Herpes* 10:60-65, 2003
19. Falagas ME, Vardakas KZ: Anti-cytomegalovirus prophylaxis in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 12:603-605, 2006

20. Razonable RR, Emery VC: Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27-29 February 2004. *Herpes* 11:77-86, 2004
21. Paya C, Humar A, Dominguez E, *et al.*: Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 4:611-620, 2004
22. Markham A, Faulds D: Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs* 48:455-484, 1994
23. Pescovitz MD, Rabkin J, Merion RM, *et al.*: Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2811-2815, 2000
24. Jung D, Dorr A: Single-dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive subjects. *J Clin Pharmacol* 39:800-804, 1999
25. Lake KD: New prophylactic treatment strategy for cytomegalovirus disease. *Am J Health Syst Pharm* 60:36, 2003
26. Curran M, Noble S: Valganciclovir. *Drugs* 61:1145-1150, 2001
27. Martindale: *Ganciclovir,*
http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_PR/Main/SBK/1/PFPUI/ARTTaC1Au35Hc/ND_PG/PRIH/CS/49696D/ND_T/HCS/ND_P/Main/DUPLICATIONSHIELDSYN_C/598990/ND_B/HCS/PFActionId/hcs.common.RetrieveDocumentCommon/DocId/19084-q/ContentSetId/30/SearchTerm/ganciclovir/SearchOption/BeginWith, Online ed, 10.11.2006
28. Brown F, Banken L, Saywell K, *et al.*: Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers. *Clin Pharmacokinet* 37:167-176, 1999

-
29. Crumpacker CS: Ganciclovir. *N Engl J Med* 335:721-729, 1996
 30. Czock D, Scholle C, Rasche FM, *et al.*: Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir in renal impairment. *Clin Pharmacol Ther* 72:142-150, 2002
 31. Sugawara M, Huang W, Fei YJ, *et al.*: Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharm Sci* 89:781-789, 2000
 32. Chou SW: Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. *Transpl Infect Dis* 2:20-24, 2001
 33. Noble S, Faulds D: Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 56:115-146, 1998
 34. SPC, Valcyte:
<http://www.legemiddelverket.no/spc/Godkjente/Valcyte%20SPC%2019.06.2003.doc>
19.11.06
 35. Campanero MA, Sadaba B, Garcia-Quetglas E, *et al.*: Development and validation of a sensitive method for the determination of ganciclovir in human plasma samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 706:311-317, 1998
 36. Åsberg A, Hansen CN, Reubsæet L: Determination of ganciclovir in different matrices from solid organ transplanted patients treated with a wide range of concomitant drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, In press
 37. *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*, US Food and Drug Administration, May 2001
 38. Bouliou R, Bleyzac N: Stability of ganciclovir in blood samples. *J Pharm Biomed Anal* 12:1205-1207, 1994

-
39. Chu F, Kiang CH, Sung ML, *et al.*: A rapid, sensitive HPLC method for the determination of ganciclovir in human plasma and serum. *J Pharm Biomed Anal* 21:657-667, 1999
 40. Schenkel F, Rudaz S, Daali Y, *et al.*: Development and validation of a new reversed-phase ion pairing liquid chromatographic method with fluorescence detection for penciclovir analysis in plasma and aqueous humor. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 826:1-7, 2005
 41. Teshima D, Otsubo K, Yoshida T, *et al.*: A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 17:500-503, 2003
 42. Page T, Sherwood C, Connor JD, *et al.*: Simple reversed-phase high-performance liquid chromatography quantitation of ganciclovir in human serum and urine. *J Chromatogr B Biomed Appl* 675:342-346, 1996
 43. Cociglio M, Peyriere H, Hillaire-Buys D, *et al.*: Application of a standardized coextractive cleanup procedure to routine high-performance liquid chromatography assays of teicoplanin and ganciclovir in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 705:79-85, 1998
 44. Wiltshire H, Hirankarn S, Farrell C, *et al.*: Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir, in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 44:495-507, 2005

8. APPENDIKS

8.1 Studieprotokoll for VICTOR-PK

TRIAL ID:	Date of protocol:
AKRONYM organ	VICTOR - PK Study - Valcyte in CMV-disease treatment of solid recipients - pharmacokinetics
PROTOCOL TITLE:	OPEN RANDOMISED STUDY TO EVALUATE EFFICACY AND SAFETY OF ORAL VALGANCICLOVIR VERSUS IV GANCICLOVIR FOR THE TREATMENT OF CMV DISEASE IN SOLID ORGAN TRANSPLANT RECIPIENTS
SUB-PROTOCOL TITLE:	EVALUATION OF GANCICLOVIR PHARMACOKINETICS WHEN ADMINISTERED BID AS ORAL VALGANCICLOVIR OR IV GANCICLOVIR IN SOLID ORGAN TRANSPLANT RECIPIENTS
PROTOCOL VERSION:	1.0
SPONSOR	F. Hoffmann-La Roche, LTD
PROJECT PHASE	III / IV
INDICATION:	CMV disease in SOT recipients
OBJECTIVES	
PRIMARY OBJECTIVE:	The primary objective of this sub-study is to compare steady state systemic exposure of ganciclovir following administration of oral valganciclovir 900 mg BID (Group A) versus IV ganciclovir 5 mg/kg BID (Group B).
SECONDARY OBJECTIVES:	The secondary objectives are: <ol style="list-style-type: none"> 1. Compare steady-state ganciclovir trough concentrations following administration of oral valganciclovir 900 mg BID (Group A) versus IV ganciclovir 5 mg/kg BID (Group B). 2. Compare relative systemic exposure of ganciclovir from oral QD versus BID valganciclovir administration. 3. Estimate associations between ganciclovir pharmacokinetic variables and efficacy. 4. Estimate associations between ganciclovir pharmacokinetic variables and safety.
STUDY DESIGN	Prospective, open. The patients recruited to this protocol are a sub-set of the patients recruited into the main protocol, reporting to selected centres, centrally randomised to either therapy, not further randomised for this sub-study.
PLANNED SAMPLE SIZE	40 patients (20 vs. 20) and post-study analysis of the whole patient population in the main study.
TOTAL NO. OF CENTERS	Approximately 5 centres aiming to recruit at least 12 patients in the main study (including one or several types of organ transplants).

STUDY DURATION	Individual subject study duration: 49 Days; recruitment period: 18 Months; overall study duration: 20 Months. FPI: NOVEMBER 2004, LPO MAY 2006.
MAIN SELECTION CRITERIA: INCLUSION:	(SEE DETAILS SECTION 5.) <ul style="list-style-type: none"> ○ Solid organ(s) transplant recipients with virological and clinical evidence of CMV disease included in the main protocol. ○ Specific informed consent for this sub protocol.
EXCLUSION:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Same as in the main protocol.
STUDY MEDICATION	<p>Group A: valganciclovir per oral 900 mg BID for 21 Days (dosage adjusted for renal function).</p> <p>Group B: ganciclovir IV 5 mg/kg BID for 21 Days (dosage adjusted for renal function).</p> <p>Both arms are followed by an oral maintenance treatment with valganciclovir per oral 900 mg QD up to Day 49 (dosage adjusted for renal function).</p>
MAIN ENDPOINT:	Steady-state, population model derived systemic exposure ($AUC_{ss, 0-12}$) of ganciclovir following oral administration of 900 mg valganciclovir in a BID schedule as compared with IV administration of 5 mg/kg ganciclovir BID.
SECONDARY ENDPOINTS:	<ol style="list-style-type: none"> 1 Compare steady-state population model derived trough concentration (C_{min}) of ganciclovir between group A and B during BID administration. 2 Compare ganciclovir relative systemic exposure during BID versus QD administration of valganciclovir from population derived, dose- and dosing interval normalized systemic exposure ($C_{ss, av}$) as well as dose normalized maximum (C_{max}) and trough (C_{min}) concentrations at steady state. 3 Analyze, by regression analysis, whether a correlation exists between CMV viremia dynamics parameters (time to viremia eradication, rate of viremia decrease, treatment success (viremia eradication, yes/no) at Day 21) versus ganciclovir pharmacokinetic variables at steady-state BID dosing ($C_{ss, av}$, C_{max}, C_{min}, time over thresholds of 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively) derived from the population model and trough concentrations in the whole patient population of the main study. 4 Analyze, by regression analysis, whether a correlation exists between safety parameters (leukocyte, neutrophil hemoglobin, thrombocyte levels) versus ganciclovir pharmacokinetic variables at corresponding time-points ($C_{ss, av}$, C_{max}, C_{min}, time over thresholds of 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively) derived from the population model and trough concentrations in the whole patient population of the main study.
STUDY PROCEDURES:	All patients included in the main study at the centres committed to the pharmacokinetic sub study will be invited to participate in this sub study. No further randomisation will be performed but inclusion in this sub study will be restricted so that the two groups will be equal in size. In addition will left-over plasma samples from the whole population in the main study be analysed within the frames of this protocol.

	<p>From the patients specifically included in this protocol, one separate blood sample for pharmacokinetic analysis will be collected at each time-point as viremia samples are drawn in the main study, from Day 0 to Day 49. In addition, between first dose and Day 4, between Day 17 and Day 20 as well as between Day 35 and Day 49 at least four blood samples are to be collected during one dosing interval at the following post-dose time intervals; 0.75 to 1.5, 2 to 5 and 5 to 9 hours. Samples will be stored as plasma locally and sent for analysis of ganciclovir concentrations by HPLC methodology at a central laboratory. Each dose given and the administration time-point, hour and minute, directly prior to a drawn sample is to be logged in the electronic CRF.</p>
RANDOMIZATION PROCEDURE	Consecutive recruitment in dedicated centres, care will be taken to achieve balanced groups.
STATISTICAL CONSIDERATIONS SAMPLE SIZE CALCULATION	A total sample size of 40 patients (20 in each group) is estimated to be sufficient for this study, based on empiric considerations. Statistical significance is set to 0.05 (two-tailed) for all analyses performed.
ASSESSMENT OF PK:	<p>Populations pharmacokinetic approaches using nonlinear mixed effects modelling (NONMEM software) will be used to analyze the sparse sampling data from the present study in order to estimate apparent clearance (CL/F) as well as apparent volume of distribution (V/F). The influence of covariates such as age, gender, estimated renal function, viral load of CMV etc will be tested on CL/F and V/F, if applicable. Secondary parameters (C_{max}, C_{min}, $C_{ss, av}$, $AUC_{0-\tau}$) will be derived from individual <i>post hoc</i> predictions.</p>
ANALYSIS PLAN:	<p>The primary endpoint (difference in systemic exposure of ganciclovir between the two treatment groups during BID dosing) shall be analyzed according to the Per-Protocol principle. The secondary endpoints shall be analyzed in the same way as the primary endpoint. Correlation analyses will be performed by linear regression.</p>

Background and Rationale

Background

Valganciclovir (Ro 107-9070) is a valyl ester prodrug of ganciclovir that is rapidly hydrolysed to ganciclovir following ingestion. Conversion to ganciclovir occurs primarily during pre-systemic absorption, with only 1-2% of absorbed valganciclovir appearing as valganciclovir in the plasma, the remainder being found as ganciclovir. The relative systemic exposure of ganciclovir from valganciclovir is approximately 60%, compared to the 6-9% absolute bioavailability of the oral ganciclovir formulation. Phase I studies in HIV infected subjects and in liver transplant recipients [23, 28] have demonstrated that exposures to ganciclovir comparable to those provided by IV and oral ganciclovir can be provided by 900 mg and 450 mg of valganciclovir, respectively. The overall ganciclovir concentration-time profile of the 900 mg dose is similar to that of an IV 5 mg/kg dose, albeit with a C_{max} of 60-70% of that of the IV formulation. It has been shown in a previous clinical trial including renal, heart and liver transplant recipients that once daily dosing with 900 mg of valganciclovir is non-inferior to that of oral ganciclovir at the approved dose of 1 g TID as anti-CMV prophylaxis treatment for the first 100 days following transplantation [45]. As the systemic exposure to the prodrug itself is low [27, 28, 46], it was expected that both the safety and efficacy profiles will parallel those of ganciclovir, a drug in widespread clinical use for 10 years, and the prophylaxis study confirmed this [45].

The pharmacokinetics of ganciclovir in solid organ transplant recipients following oral administration of valganciclovir has been investigated in several trials [23, 28, 46, 47]. However, these data are based on QD dosing and there is no available data on BID dosing of valganciclovir in this patient population. BID dosing pharmacokinetics of valganciclovir have however been reported for treatment of CMV retinitis treatment in HIV patients [27].

There is little information in the literature regarding serum concentrations of ganciclovir and its relevance with regards to treatment efficacy. A previous study in 281 AIDS patients treated with ganciclovir for CMV retinitis showed that the time to progression of the retinitis was best correlated with the systemic ganciclovir exposure (AUC_{0-24}) [48]. In transplant recipients there is no similar data that link systemic exposure of ganciclovir to efficacy or safety of the drug. Erice *et al* [49] measured peak and trough concentrations in 31 immunocompromised patients (6 organ transplant recipients). They did not find any relationship between efficacy, or side-effects (neutropenia), of treatment and ganciclovir concentrations. Campos *et al* [50] presented an abstract on peak and trough concentrations measurements of ganciclovir in 26 transplant patients. No correlation between side-effects (decrease in granulocytes) and ganciclovir concentrations was evident in this abstract. Peak and trough concentrations of ganciclovir were also measured in 69 organ transplanted patients, 44 received ganciclovir prophylaxis and 25 were treated for CMV disease [12]. Neither treatment efficacy (i.e. development of CMV viremia or relapsed infection) nor toxicity was correlated with peak or trough serum concentrations of ganciclovir.

Rationale

In solid organ transplant recipients there is no available information on pharmacokinetics of ganciclovir following oral BID administration of valganciclovir. These data will be of importance in order to being able to compare the pharmacokinetics with both IV BID ganciclovir treatments as well as with QD dosing of oral valganciclovir in solid organ transplants.

It is currently not known if the serum level of ganciclovir is associated with treatment efficacy and/or toxicity in solid organ transplant recipients infected with CMV. The present study aims to investigate the associations between different pharmacokinetic parameters and treatment efficacy and/or toxicity in a large cohort of transplanted patients. Such data may be of importance for individualizing doses of valganciclovir in different clinical settings and will be able to indicate if Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is of relevance for valganciclovir in this population.

It is expected that results from the nonlinear mixed effects modelling analysis of the sparse pharmacokinetic data in the subpopulation selected for this sub protocol will provide pharmacokinetic parameters relevant for the target population and will allow quantifying the influence of various covariates on the pharmacokinetic parameters using the even more sparse data from the whole study population. The population pharmacokinetic analysis should allow the determination of the sources of the variability in plasma exposure of ganciclovir in the true population due to factors such as age, gender, body size, renal function, CMV viremic load etc. With population-based data analysis it will be possible to obtain quantitative information on the average pharmacokinetic parameters of interest in the target population as well as to estimate individual parameters for each patient. Furthermore, estimates of intra- and interindividual variability of the population will be obtained.

Study Objectives

Primary Objective

The primary objective of this sub-study is to compare steady state systemic exposure ($AUC_{SS, 0-12}$) of ganciclovir following administration of oral valganciclovir 900 mg BID (Group A) versus IV ganciclovir 5 mg/kg BID (Group B).

Secondary Objectives

1. Compare steady state ganciclovir trough concentrations (C_{min}) following administration of oral valganciclovir 900 mg BID (Group A) versus IV ganciclovir 5 mg/kg BID (Group B).
2. Compare relative systemic exposure ($C_{ss, av}$, C_{max} , C_{min}) of ganciclovir from oral BID (first 21 Days) versus QD (subsequent 28 Days) administration of valganciclovir at steady state.

3. Estimate associations between ganciclovir pharmacokinetic variables ($C_{ss, av}$, C_{max} , C_{min} , time over thresholds of 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and efficacy.
4. Estimate associations between ganciclovir pharmacokinetic variables ($C_{ss, av}$, C_{max} , C_{min} , time over thresholds of 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and safety.

Study Design

Design

The overall study design is equivalent to the main study; an open, randomised, parallel group study. Specifically recruited patients to this sub-study will be investigated in the early phase after randomisation, during steady-state BID as well as QD dosing. Sub-study specific samples will be drawn and ganciclovir plasma concentrations will be analysed as described below. A previously developed pharmacokinetic population model for ganciclovir and valganciclovir QD dosing [47] will be used as template for the development of the model that will be used to analyse the ganciclovir concentrations in this study.

Blood is drawn twice weekly during the first 21 days and weekly up to day 49 in addition to month 3 and 6 from all patients in the main study. These samples are primarily to be analysed for CMV viremia, but also for other viruses and ganciclovir resistance. Left-over samples will be made available for this sub-study and samples from these patients will be analysed for ganciclovir concentrations. These trough concentrations will be included in the pharmacokinetic population model to be developed and estimated systemic exposures used for association analyses of ganciclovir exposure versus efficacy as well as safety.

Treatment Groups

All patients at selected centres are to be invited to this sub-study. Patients will be consecutively included without any further randomization or other alterations in treatment from the main study. Care will however be taken to get an evenly distribution of group A and B (20 in each group)

Procedures

Sampling

Blood samples for determination of pharmacokinetic parameters, using a sparse pharmacokinetic sampling, will be taken from all patients who give their specific informed consent to participate in the present sub-study at all time-points CMV-viremia samples are drawn in the main study (twice weekly first three week and weekly for the next four weeks). A total of at least 4 blood samples will also be taken on each of 3 days at the following nominal time points:

Between 1st Dose and Study Day 4:

(1) predose, (2) 0.75 to 1.5 hours post dose, (3) 2 to 5 hours post dose and (4) 5-9 hours post dose.

Between Study Day 17 and 20:

(1) predose, (2) 0.75 to 1.5 hours post dose, (3) 2 to 5 hours post dose and (4) 5-9 hours post dose.

Between Study Day 35 and 49:

(1) predose, (2) 0.75 to 1.5 hours post dose, (3) 2 to 5 hours post dose and (4) 5-12 hours post dose.

The pre dose blood sample must be obtained before the morning dose of Study Drug is taken. Study Drug should preferably be taken within 30 minutes after a light breakfast, similar performance at each investigation day. The time of dosing with Study Drug and time of collection of each blood sample will be recorded in the appropriate electronic case report form.

Preparation and Storage

Blood samples should be drawn in pre-chilled EDTA tubes on ice and centrifuged at 4°C (800 g for 20 minutes) within one hour [38]. Plasma is transferred to cryovials and stored at -20°C, or lower, until shipment to the central laboratory in Norway.

Sending

For each patient should samples collected in this sub-study be shipped together with the samples collected in the main study. Procedures are outlined in detail in the main study, Appendix 3.

Ganciclovir analysis

The plasma samples will be analyzed for ganciclovir by a validated liquid chromatographic method using solid phase sample preparation. In case clinical samples are below the limit of quantification (BLQ) the analysis assay will be revalidated at such lower concentration range and the samples will be reanalyzed.

Number of Centers

About five to six centers that are scheduled to include at least 12 patients into the main study will be invited to participate in the sub-study specific part of this protocol. Each centre should be able to contribute with pharmacokinetic sampling from at least 8 patients.

Selection Criteria***Study Population***

As in the main study: Solid organ(s) transplant recipients with virological and clinical evidence of CMV disease at any time following transplantation, regardless of CMV status (D±/R±) or previous anti-CMV therapy or preventive approaches.

Inclusion Criteria

1. Specific informed consent for this sub-protocol.

Exclusion Criteria

Same as in the main study.

Laboratory Assessments

Samples from both group A and B will be analyzed, at a central laboratory, for ganciclovir concentration only, using validated liquid chromatographic methods.

Pharmacokinetic Parameters***Population model***

Nonlinear mixed effects modeling (NONMEM software and Intel Fortran (version 8) compilation tool) will be used to analyze the sparse-sampling dose-concentration-time data for ganciclovir after valganciclovir and ganciclovir administration using a population approach. The pharmacokinetic profile data will be used to develop a pharmacokinetics model including the effect of major covariates (e.g. age, gender, body size, renal function, viral load of CMV etc.) on CL/F and V/F. The starting model will be derived from valganciclovir QD dosing data from the PV 16000 study [47] and model development will be based on the data from the specifically included patients in the present sub study. Patients in this phase of the development of the model will be defined as ‘evaluable’ for pharmacokinetic analysis if they have at least two usable samples on one occasion. The model will be further developed, and used, by using trough concentration data on all patients in the main study.

Exclusion of patient data will only be allowed if ganciclovir concentrations have not been able to be measured accurately or in case of severe protocol deviations or unavailable information that may interfere with pharmacokinetic evaluation, e.g. exact blood sampling time or dose given.

Endpoint Evaluations

Primary Endpoint

Compare steady-state, population model derived systemic exposure ($AUC_{ss, 0-12}$) of ganciclovir following oral administration of 900 mg valganciclovir in a BID schedule as compared with that derived from IV administration of 5 mg/kg ganciclovir BID.

Secondary Endpoints

2. Compare steady-state population model derived trough concentration (C_{min}) of ganciclovir between group A and B during BID administration.
3. Compare ganciclovir relative systemic exposure during BID versus QD administration of valganciclovir from population derived, dose- and dosing interval normalized systemic exposure variable estimates ($C_{ss, av}$, C_{max} , C_{min}) in the two treatment groups at steady state.
4. Analyze, by regression analysis, whether a correlation exists between CMV viremia dynamics parameters (time to viremia eradication, rate of viremia decrease, treatment success (viremia eradication, yes/no) at Day 21) versus ganciclovir pharmacokinetic variables at steady-state with BID dosing ($C_{ss, av}$, C_{max} , C_{min} , time over thresholds of 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively) derived from the population model and actual measured C_{trough} concentrations in the whole patient population of the main study.
5. Analyze, by regression analysis, whether a correlation exists between safety parameters (leukocyte, neutrophil, hemoglobin, thrombocyte levels) versus ganciclovir pharmacokinetic variables at corresponding time-points ($C_{ss, av}$, C_{max} , C_{min} , time over thresholds of 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively) derived from the population model and actual measured C_{trough} concentrations in the whole patient population of the main study.

Study Medication

Patients will use the same treatment as in the main study and there will be no sub-study specific adjustments in doses.

Group A: valganciclovir per oral 900 mg BID for 21 Days (dosage adjusted for renal function).

Group B: ganciclovir IV 5 mg/kg BID for 21 Days (dosage adjusted for renal function).

Both arms are followed by an oral maintenance treatment with valganciclovir per oral 900 mg QD up to Day 49 (dosage adjusted for renal function).

Statistical Considerations

Sample Size

The present descriptive sub-study will need to include 40 patients (20 in each group) in order to develop a pharmacokinetic population model for BID dosing based on previous models derived from QD dosing. The number of patients is based on empiric considerations.

In the efficacy and safety correlation analyses available samples from all patients in the main study will be analyzed for ganciclovir concentrations and included in these analyses.

Analysis Plan

For the Per-Protocol population to be analysed in the present study, all patients specifically included in the present sub study that have at least two evaluable samples at both investigations times during BID dosing. No data replacement will be performed. Statistical significance is set to 0.05 (two-tailed). Confidence intervals (95%) will be calculated for ratios when applicable. Since this study is not sized to obtain inferential conclusions, statistical significances will be reported with descriptive value only. If applicable, ex post-facto power of clinically relevant findings will be reported.

Primary Endpoint

The primary end-point, comparison of $AUC_{ss, 0-12}$ between group A and B at steady-state BID dosing, will be analysed in all patients from whom this variable has been estimated. Summary data will be reported as central tendency and dispersion. The 95% confidence interval will be reported and data shall be compared by ANOVA of original data (if homogeneity of variance is confirmed) or of log-transformed data. In case also the log-transformed data do not show homogeneity of variance, distribution-independent tests will be applied.

The primary pharmacokinetic parameters (e.g. CL/F and V/F) for valganciclovir/ganciclovir will be estimated by means of NONMEM analysis of the sparse pharmacokinetic data of patients specifically included in the present sub study. The selection of parameters and the derivation of individual measures of exposure, $AUC_{ss, 0-12}$, will depend on the final pharmacokinetic model used for this analysis.

Secondary Endpoints

6. Compare steady-state, BID dosing, C_{min} between group A and B in all patients with these data estimated from the pharmacokinetic population model. Summary data will be reported as central tendency and dispersion. The 95% confidence interval will be reported and data shall be compared by ANOVA of original data (if homogeneity of variance is confirmed) or of log-transformed data. In case also the log-transformed data do not show homogeneity of variance, distribution-independent tests will be applied.
7. Compare ganciclovir relative systemic exposure during BID versus QD administration of oral valganciclovir administration by comparing dose- and dosing interval normalized systemic exposures ($C_{ss, av}$), as well as dose normalized maximum (C_{max}) and trough (C_{min}) concentrations derived from the population model during steady state. Summary data will be reported as central tendency and dispersion. The 95% confidence interval will be reported and data shall be compared by ANOVA of original data (if homogeneity of variance is confirmed) or of log-transformed data. In case also the log-transformed data do not show homogeneity of variance, distribution-independent tests will be applied.
8. Regression analyses with parameters derived from trough concentrations of patients in the main study at steady-state, BID dosing of IV ganciclovir or oral valganciclovir will be performed as one group. CMV viremia dynamics parameters (time to viremia eradication, rate of viremia decrease, treatment success (viremia eradication, yes/no) at Day 21) will be analyzed versus ganciclovir pharmacokinetic variables ($C_{ss, av}$, C_{max} , C_{min} , time over thresholds of 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively). It is anticipated that an exploratory analysis will be performed to compare group A and B.
9. Regression analyses with parameters derived from trough concentrations in of patients in the main study at relevant, and corresponding, time-points during ganciclovir/valganciclovir treatment will be performed as one group. Safety parameters (leukocyte, neutrophil, hemoglobin, thrombocyte levels) will be analyzed versus time-matched ganciclovir pharmacokinetic variables ($C_{ss, av}$, C_{max} , C_{min} , time over thresholds of 2 $\mu\text{g/mL}$ and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively). It is anticipated that an exploratory analysis will be performed to compare group A and B.

For all the secondary endpoints the analysis of the primary pharmacokinetic parameters (e.g. CL/F and V/F) for valganciclovir/ganciclovir will be estimated by means of NONMEM analysis of the sparse pharmacokinetic data of patients specifically included in the present sub study. The selection of parameters and the derivation of individual measures of exposure, $C_{ss, av}$, C_{min} , C_{max} and threshold levels will depend on the final pharmacokinetic model used for this analysis.

Study Duration

As in the main study.

Safety Issues

This sub-study does not include any specific safety assessments, but is run under the coverage of the main protocol.

Adverse Events (AE) and Serious Adverse Events (SAE) are to be reported in according with the procedures in the main protocol.

References

1. Brown F, et al. Final Report of Study WP15711. The pharmacokinetics of ganciclovir following oral valganciclovir (Ro107-9070), oral ganciclovir and intravenous ganciclovir in liver transplant recipients. *Report No. W-144127* 1999.
2. Pescovitz MD, Rabkin J, Merion RM, Paya CV, Pirsch J, Freeman RB, O'Grady J, Robinson C, To Z, Wren K, Banken L, Buhles W, Brown F. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2811-2815.
3. Saywell K, et al. Final Report of Study WP15347. The pharmacokinetics of four different doses of RS-79070 [Valganciclovir, now Ro107-9070] following multiple dosing (with and without food). *Report No. W-144073* 1998.
4. Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Pescovitz MD. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 611-620. Order.
5. Martin DF, Sierra-Madero J, Walmsley S, Wolitz RA, Macey K, Georgiou P, Robinson CA, Stempien MJ. A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis. *N Engl J Med* 2002; 346: 1119-1126.
6. Investigational Drug Brochure for Ro107-9070 [Valganciclovir, formerly RS-79070]. *Research Report 1014035* 2004; 7th version.
7. PV16000 Report. Roche on file.
8. Lalezari JP, Friedberg DN, Bissett J, Giordano MF, Hardy WD, Drew WL, Hubbard LD, Buhles WC, Stempien MJ, Georgiou P, Jung DT, Robinson CA. High dose oral ganciclovir treatment for cytomegalovirus retinitis. *J Clin Virol* 2002; 24: 67-77.
9. Erice A, Jordan MC, Chace BA, Fletcher C, Chinnock BJ, Balfour HH, Jr. Ganciclovir treatment of cytomegalovirus disease in transplant recipients and other immunocompromised hosts. *JAMA* 1987; 257: 3082-3087. Order.
10. Campos F, Pou L, Pascual C. Serum monitoring of ganciclovir (abstract 47). *Ther Drug Monit* 1993; 15: 156.
11. Fishman JA, Doran MT, Volpicelli SA, Cosimi AB, Flood JG, Rubin RH. Dosing of intravenous ganciclovir for the prophylaxis and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2000; 69: 389-394.
12. Boulieu R, Bleyzac N. Stability of ganciclovir in blood samples. *J Pharm Biomed Anal* 1994; 12: 1205-1207. Order.

8.2 Artikel

Determination of ganciclovir in different matrices from solid organ transplanted patients treated with a wide range of concomitant drugs

Anders Åsberg^{1*}, Christin Nupen Hansen¹, Leon Reubsaet²

Departments of Pharmaceutical Biosciences¹ and Pharmaceutical Chemistry², School of Pharmacy, University of Oslo, P.O.Box 1068 Blindern, 0316 Oslo, Norway.

Short tile: GCV analysis in transplanted patients

Key words: counter ion; fluorescence detection; ganciclovir; reversed phase chromatography; solid organ transplanted patients; valganciclovir

**Corresponding author:*

Professor Anders Åsberg

Phone: +47 918 13 624

Fax: +47 22 85 44 02

E-mail: anders.asberg@farmasi.uio.no

ABSTRACT

The aim of the present study was to develop a time-efficient chromatographic method for the analysis of therapeutic concentrations of ganciclovir (GCV) in plasma, urine as well as dialysate (from continuous renal replacement therapy) from solid organ transplant recipient treated with either GCV or its prodrug valganciclovir (VGCV) in combination with a wide variety of other concomitant drugs. Sample preparation was performed by reversed phase solid phase extraction and was followed by separation of the analytes on a reversed phase column using isocratic elution with a mobile phase consisting of acetonitrile – a counter ion (50 mM 1-heptanesulfonic acid) in an aqueous sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 2.1; 10 mM) (10:90, v/v) and a fluorescence detector. Validation of the method showed linearity within the concentration range of 0.1 to 40 µg/mL for plasma and 0.1 to 120 µg/mL for urine and dialysate ($R^2 > 0.99$, $n \geq 5$). Accuracy and precision (evaluated at 0.1, 5 and 40 µg/mL) were both satisfactory. The LLOQ was determined to be 0.1 µg/mL. The method was successfully applied on clinical samples from renal transplant recipients treated with VGCV in combination with a variety of usually used concomitant drugs for solid organ transplant recipients.

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infections are the most common infections following solid organ transplantation and is the direct cause of a variety of clinical disorders (gastritis, colitis, hepatitis, retinitis and pneumonia) associated with substantial morbidity and mortality in solid organ transplanted patients [12]. The incidence of symptomatic disease related to CMV infection varies between different transplant settings, but is in general between 5 to 50% [10, 51-56]. CMV infections are also important in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients due to their immunosuppressed state, even though the present incidence is lower as compared to the pre- HAART (highly active antiretroviral therapy) era, and is still strongly associated with death in AIDS patients [57].

The nucleoside analog ganciclovir (GCV), 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (figure 1), is the gold standard for treatment of CMV infections [58, 59]. The valyl ester prodrug of GCV, valganciclovir (VGCV, figure 1) was recently introduced in the market and with its considerably higher oral bioavailability of GCV it seems to be an alternative to intravenous administration of GCV [21, 23, 27, 44]. The valyl ester is rapidly, extensively and irreversibly converted to GCV drug in the absorption phase and more than 97% of absorbed VGCV appear in the systemic circulation as GCV [23, 44]. Therapeutic drug monitoring of ganciclovir during treatment of CMV infections is not generally applied but the course of the infection is rather followed by viremia measurements [60]. However, therapeutic drug monitoring is extensively used in solid organ transplant recipients and could possibly also be relevant for GCV, and its new prodrug VGCV. To further elucidate on the relevance of GCV drug monitoring in this populations, especially with regard to efficacy and side-effects further

investigations on its pharmacokinetics is needed. This requires a fast and sensitive bio-analytical method that can be applied in several matrices, such as plasma, urine and renal replacement dialysate. In addition, it is also important that the method is selective with regard to co-administered drugs since solid organ transplant recipients are treated with a wide variety of drugs. Previously published methods have not been shown to have all these characteristics [35, 38, 39, 41-43, 61, 62]. In this paper we describe a reversed phase HPLC method fulfilling these criteria by combining 1-heptanesulfonic acid (figure 1) as a counter ion and applying fluorescence detection for selective and sensitive determination of GCV in plasma, urine and dialysate.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

All chemicals were of analytical-reagent grade. Distilled water was used for all aqueous solutions. Ganciclovir, acyclovir (internal standard = IS, figure 1) and 1-heptanesulfonic acid sodium salt were purchased from Sigma (Germany), sodium dihydrogen phosphate from Prolabo (France), acetonitrile and methanol from Merck (Germany) and ortho-phosphoric acid 85% from Fluka (Switzerland).

Aqueous stock solutions of both GCV (1 mg/mL) and IS (250 µg/mL) were prepared and stored at -20 °C.

Sample preparation

A previously described solid phase extraction [61] was slightly modified for our purpose. In brief the following procedure was applied: sample (200 µL plasma, urine or dialysate) spiked with 10 µL IS was applied to a 30 mg (1 mL) Oasis HLB cartridge (Water Oasis, Ireland) which had been preconditioned with 1 mL methanol and 1 mL water. After sample application the cartridge was washed with 250 µL water (for plasma samples) or 1 mL of water (for urine and dialysate). GCV and IS were in the next step eluted with 750 µL of 10% methanol. Finally the eluate was evaporated to dryness in a SpeedVac concentrator (ThermoSavant, US) making sure that the temperature was kept below 50 °C. The residue was dissolved in 200 µL of 5 mM 1-heptanesulfonic acid and 10 mM sodium dihydrophosphate buffer (pH 2.1), vortexed for 10 seconds, centrifuged at 10,000 g for 10 minutes at room temperature and the clear supernatant was transferred to sample vials of glass (Agilent Technologies, Germany). An aliquot of 30 µL was injected in the high-performance liquid-chromatography (HPLC) system.

Instrumentation and chromatographic conditions

An Agilent series 1100 HPLC equipped with a quaternary pump, temperature controlled auto injector and column compartment and fluorescence detector fitted with an 8 µL flow cell were used (Agilent Technologies, Germany). Since retention times are kept short, there are, especially in the case of urine, high signals near the injection front which interfere with the GCV determination using UV detection. Fluorescence detection was chosen instead to make the detection of ganciclovir more specific. The detector was operated at an excitation wavelength of 265 nm and an emission wavelength of 378 nm. The separation was performed on an Agilent Zorbax® SB-Aq reversed-phase column (150 x 4.6 mm, 5 µm) with a corresponding guard column, by isocratic elution with a mixture of acetonitrile – 50 mM 1-heptanesulfonic acid in 10 mM sodium dihydrophosphate buffer (pH 2.1) (10:90; v/v) at a flow-rate of 1.0 mL/min. Each run took no longer than 6 minutes. The auto sampler tray was kept at 10 °C while the column temperature was 25 °C.

HPLC ChemStation® LC 3D (Agilent Technologies, Germany) software was used to control the machine and to analyze the chromatographic data.

Method validation

The validation of the method was performed based on FDA guidelines for Bioanalytical Method Validation [63]. Blood was drawn into EDTA vacutainer tubes on ice, centrifuged at 800 g (4 °C) for 20 minutes from which plasma was decanted and stored at -20 °C until analysis was used for the full validation of the method. Both drug free plasma from healthy volunteers at the laboratory as well as plasma with and without ganciclovir from renal transplant recipients on different commonly occurring drug combinations for solid organ transplant recipients was used. Plasmas were not pooled but analyzed individually. Urine from one healthy, drug free, volunteer and GCV free dialysate from one patient treated with continuous renal replacement therapy was used for cross validation of the method for these matrices. The Regional Committee for Medical Research Ethics, health region south approved the collection of these samples and patients donating blood gave their informed consent.

The concentration of the compounds in the different matrices was determined from their peak heights, using acyclovir as IS. Peak height is chosen above peak area since small peaks, eluting near the internal standard will have larger influence on the result when peak area is used. Linearity was tested both for the plasma standard curve (ranging 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 and 40 µg/mL) as well as for the urine and dialysate standard curves (ranging 0.05, 0.1, 1, 5, 10, 20, 40 and 120 µg/mL). Plasma from three drug-free individuals were spiked with 0.1, 0.3, 6, 24 and 40 µg/mL to determine the lower limit of quantification (LLOQ), accuracy and precision

of within- as well as between-day runs. Absolute recovery was determined at 0.3, 6 and 24 µg/mL by comparing the response of extracted samples spiked before extraction with the response of extracted blank samples spiked after extraction. Selectivity was determined in plasma from nine renal transplant recipients on commonly occurring drug combinations for solid organ transplant recipients. One plasma sample spiked to a concentration of 60 µg/mL was diluted with different plasma to investigate the applicability of diluting samples outside of the standard curve. The GCV concentration in plasma from six renal transplanted patients treated with GCV/VGCV were also determined. Long-term -20 °C storage and freeze-thaw stability was not tested as this has been performed by others previously [39]. Stability of GCV at 4 °C was tested in periods from one night in the auto sampler to 7 weeks in the refrigerator.

RESULTS AND DISCUSSION

Sample preparation and chromatography

A previously described SPE extraction procedure [61] for the preparation of human plasma was modified in the present study and showed also to be applicable for urine and dialysate matrices. Samples were applied directly on the reversed phase SPE cartridge and washed with water to elute highly hydrophilic compounds. Washing with acidified water did not affect the extraction procedure. GCV and IS was eluted with 10 % methanol and 750 µL was needed to achieve an appropriate recovery (Table 1). The eluate was evaporated to dryness in a vacuum concentrator at < 50 °C. Samples were dissolved in 5 mM 1-heptanesulfonic acid in 10 mM sodium dihydrophosphate buffer (pH 2.1), allowing complex formation before application on the HPLC system.

Representative chromatograms of the analysis of both plasma and urine samples from two patients is shown in figure 2. Therapeutic GCV plasma concentrations in solid organ transplant recipients receiving oral VGCV therapy typically range from 0.2 to 20 µg/mL [44]. At these levels the peaks of GCV and IS were baseline separated. At higher levels there was no baseline separation, however, this did not interfere with the peak height estimations and linearity was obtained in the full standard curve range. The retention times of GCV and IS were 3.4 and 3.8 minutes, respectively. A total run time of 6 minutes was appropriate as long as a washing run was included every 12th injection to minimize carry-over. During the washing run the ACN concentration was gradually increased to 50% over a period of 4 minutes, kept at 50% for 12 minutes and reversed back to 10% over a period of 4 minutes (total wash time was 20 minutes).

Validation of the method

Plasma samples from nine renal transplant recipients not treated with GCV, VGCV, acyclovir or valaciclovir showed no interfering peaks in the present method. A summary of drugs these patients were treated with are given in table 2. This makes the method suitable for application in these patients as long as they are not treated with acyclovir or its derivatives. The method showed appropriate linearity within the selected concentrations ranges of 0.05 to 40 µg/mL for plasma and 0.1 to 120 µg/mL for urine and dialysate as long as the standard curves were split in two. Characteristics for the plasma, urine and dialysate standard curves are shown in table 3. The method also allowed dilution of samples showing concentrations above the given standard curve range. The average deviation from the nominal value of 1:2 and 1:4 dilutions was closer to zero than -7%, with a linear regression $R^2 > 0.99$. The coefficient of variation (CV) for the standard curves for all three matrices were below 17.5% at LLOQ (0.1 µg/mL) and below 12.0% at the other concentrations, which is within acceptable limits (table 4) [63].

The accuracy was determined in multiple parallels of plasma and deviated less than ±10% within run and less than ±7.3% between-run from the true values within the range of the standard curve (table 4, table 5). Corresponding within run data for urine and dialysate is also shown in table 4.

The within-run precision measured both in 5 parallels of spiked plasma (0.1, 5 and 40 µg/mL) and in 4 parallels of spiked urine and dialysate (0.1, 5 and 40 µg/mL) ranged from 3% to 17%. The between-run precision in spiked plasma (0.1, 5 and 40 µg/mL) ranged from 9.8% to 14.6%.

The recovery for all analytes ranged from 56% to 68% (table 1).

Based on repeated measurements was LLOD determined to be 0.05 µg/mL and LLOQ to be 0.1 µg/mL for GCV (table 4).

GCV has previously been shown to be stable during storage at -20°C for at least 20 months [39]. In addition showed samples good stability at 4 °C and could be reanalyzed following a night in the auto injector. The analytes were actually stable enough so that reanalyzes was feasible following storage (table 5) for up to 7 weeks in a refrigerator (4°C).

Application of the method

The method was developed to determine GCV in human plasma, urine and in dialysate from continuous renal replacement therapy in pharmacokinetic investigations. Special emphasis on selectivity towards commonly co-administrated drugs in solid organ transplant recipients resulted in an applicable method for pharmacokinetic

investigations in this patient population. The LLOQ is appropriate for measurement of trough concentrations in a clinical setting for these patients and the upper concentration of the standard curve should cover extraordinary high levels that may be found during acute renal failure. The plasma concentration of GCV was 0.2, 1.0 and 2.7 µg/mL in three solid organ transplant recipients treated with oral VGCV at standard doses once daily (QD) for CMV viremia. In figure 3 is the mean ± SD of three solid organ transplant recipients treated with oral VGCV twice daily (BID) for CMV disease shown, both on the 3rd as well as the 21st day of treatment. Urine concentration of GCV in three other transplanted patients was 7.5, 47.4 and 115.9 µg/mL following oral QD VGCV therapy. In case of extraordinary high concentrations of GCV it has been shown that dilution of the samples before reanalysis is feasible.

CONCLUSION

In the present work we presented a simple, sensitive and time efficient method for analysis of GCV in human plasma, urine and dialysate from continuous renal replacement therapy. Sample preparation was performed by SPE, followed by HPLC separation and detection using a fluorescence detector without prior conjugation reactions. The LLOQ was 0.1 µg/mL and the method was linear up to concentrations well above therapeutic concentrations. The method was successfully applied on samples from renal transplant recipients treated with a wide variety of concomitant drugs which would make it feasible for use in pharmacokinetic investigations as well as in therapeutic drug monitoring in this patient population.

REFERENCES

- [1] J.A. Fishman, R.H. Rubin. *N Engl J Med.* 338 (1998) 1741-1751.
- [2] S. Sagedal, K.P. Nordal, A. Hartmann, M. Degre, E. Holter, A. Foss, K. Osnes, T. Leivestad, P. Fauchald, H. Rollag. *Transplantation.* 70 (2000) 1166-1174.
- [3] R.L. Smyth, J.P. Scott, L.K. Borysiewicz, L.D. Sharples, S. Stewart, T.G. Wreghitt, J.J. Gray, T.W. Higenbottam, J. Wallwork. *J Infect Dis.* 164 (1991) 1045-1050.
- [4] T.C. Bailey, E.P. Trulock, N.A. Ettinger, G.A. Storch, J.D. Cooper, W.G. Powderly. *J Infect Dis.* 165 (1992) 548-552.
- [5] M.V. Soghikian, V.G. Valentine, G.J. Berry, H.R. Patel, R.C. Robbins, J. Theodore. *J Heart Lung Transplant.* 15 (1996) 881-887.
- [6] T.C. Merigan, D.G. Renlund, S. Keay, M.R. Bristow, V. Starnes, J.B. O'Connell, S. Resta, D. Dunn, P. Gamberg, R.M. Ratkovec, et al. *N Engl J Med.* 326 (1992) 1182-1186.
- [7] E. Gane, F. Saliba, G.J. Valdecasas, J. O'Grady, M.D. Pescovitz, S. Lyman, C.A. Robinson. *Lancet.* 350 (1997) 1729-1733.
- [8] R. Patel, D.R. Snyderman, R.H. Rubin, M. Ho, M. Pescovitz, M. Martin, C.V. Paya. *Transplantation.* 61 (1996) 1279-1289.
- [9] P.D. Griffiths. *J Clin Virol.* 12 (2006) 489-492.
- [10] E. De Clercq. *J Clin Virol.* 30 (2004) 115-133.
- [11] A. Erice. *Clin Microbiol Rev.* 12 (1999) 286-297.
- [12] M.D. Pescovitz, J. Rabkin, R.M. Merion, C.V. Paya, J. Pirsch, R.B. Freeman, J. O'Grady, C. Robinson, Z. To, K. Wren, L. Banken, W. Buhles, F. Brown. *Antimicrob Agents Chemother.* 44 (2000) 2811-2815.
- [13] H. Wiltshire, S. Hiranakarn, C. Farrell, C. Paya, M.D. Pescovitz, A. Humar, E. Dominguez, K. Washburn, E. Blumberg, B. Alexander, R. Freeman, N. Heaton. *Clin Pharmacokinet.* 44 (2005) 495-507.
- [14] C. Paya, A. Humar, E. Dominguez, K. Washburn, E. Blumberg, B. Alexander, R. Freeman, N. Heaton, M.D. Pescovitz. *Am J Transplant.* 4 (2004) 611-620.
- [15] D.F. Martin, J. Sierra-Madero, S. Walmsley, R.A. Wolitz, K. Macey, P. Georgiou, C.A. Robinson, M.J. Stempien. *N Engl J Med.* 346 (2002) 1119-1126.
- [16] J.C. Scott, N. Partovi, M.H. Ensom. *Ther Drug Monit.* 26 (2004) 68-77.
- [17] T. Page, C. Sherwood, J.D. Connor, T. Tarnowski. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 675 (1996) 342-346.
- [18] D. Teshima, K. Otsubo, T. Yoshida, Y. Itoh, R. Oishi. *Biomed Chromatogr.* 17 (2003) 500-503.
- [19] M. Tsuchie, S. Hara, M. Kimura, M. Fujii, N. Ono, M. Kai. *Anal Sci.* 17 (2001) 811-814.
- [20] R. Boulieu, N. Bleyzac. *J Pharm Biomed Anal.* 12 (1994) 1205-1207.
- [21] M.A. Campanero, B. Sadaba, E. Garcia-Quetglas, J.R. Azanza. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 706 (1998) 311-317.
- [22] M. Cociglio, H. Peyriere, D. Hillaire-Buys, R. Alric. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 705 (1998) 79-85.

- [23] F. Chu, C.H. Kiang, M.L. Sung, B. Huang, R.L. Reeve, T. Tarnowski. *J Pharm Biomed Anal.* 21 (1999) 657-667.
 [24] A. Loregian, R. Gatti, G. Palu, E.F. De Palo. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 764 (2001) 289-311.
 [25] US Food and Drug Administration. May (2001).

Table 1. Absolute recovery for GCV at three concentrations levels (n=4 at each level) as well as for IS (acyclovir, n=12).

	Recovery	SD
GCV 0.3 µg/mL	58%	4.5%
GCV 6 µg/mL	68%	2.8%
GCV 24 µg/mL	56%	0.6%
IS (ACV)	60%	5.0%

Table 2. Selectivity of the method. No interference was shown during analysis of plasma samples from patients treated with the following drugs.

Allopurinol	Felodipine	Nifedipine
Amilorid	Fluvastatin	Pantoprazol
Amlodipine	Frusamid	Prednisolone
Aspirine	Hydrochlorthiazide	Ranitidin
Atorvastatin	Irbesartan	Sirolimus
Calcitriol	Isosorbide	Spirolactone
Cyclosporine A	Lisinopril	Sulphamethoxazol
Darbepoetin alpha	Metoprolol	Tacrolimus
Esomeprazol	Mycophenolate mofetil	Trimethoprim
Everolimus	Nateglinide	

Table 3. Standard curve (mean ±SEM peak height ratios) characteristics according to the general formula $y=ax+b$.

	Low concentration range (µg/mL) (plasma: 0.1 to 2.5) (urine/dialysate: 0.1 to 5)			High concentration range (µg/mL) (plasma: 2.5 to 40) (urine/dialysate: 5 to 120)			
	a	b	R ²	a	b	R ²	n
Plasma	0.1013 ±0.0019	0.0002 ±0.0012	0.9996	0.0936 ±0.0048	-0.0279 ±0.024	0.9989	5
Urine	0.0454 ±0.0027	-0.0061 ±0.0014	0.991	0.0480 ±0.0017	-0.0287 ±0.029	0.9997	4
Dialysate	0.0713 ±0.0030	-0.0233 ±0.0011	0.9997	0.0455 ±0.0025	-0.2893 ±0.050	0.994	4

Table 4. Accuracy and precision for plasma, urine and dialysate samples spiked with known amounts of GCV.

	Nominal conc. (µg/mL)	Measured conc. (µg/mL)	Bias	CV
Plasma	0.1 (n=5)	0.12	17.5%	10.3%
	0.3 (n=8)	0.33	8.8%	5.6%
	2.5 (n=8)	2.40	-4.0%	7.3%
	6 (n=8)	5.5	-9.1%	8.0%
	24 (n=8)	21.5	-10.4%	8.2%
	40 (n=5)	39.6	-1.0%	12.0%
Urine	0.1 (n=4)	0.12	23.1%	17.5%
	5 (n=4)	5.06	1.3%	10.3%
	40 (n=4)	40.8	2.0%	6.8%
Dialysate	0.1 (n=4)	0.11	7.8%	14.7%
	5 (n=4)	4.99	-0.3%	8.2%
	40 (n=4)	46.3	15.6%	3.5%

CV, coefficient of variation

Table 5. Between-run variance (RSD, n=3), between-run accuracy and average difference in concentration from immediate analysis and following storage one night in auto sampler to seven weeks at 4°C.

Concentration	RSD (%)	Accuracy (%)	Relative conc. difference storage
0.1	20.4	-7.3%	5.5%
5	10.2	3.5%	0.2%
40	9.8	2.7%	-0.1%

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Structural formulas of ganciclovir, valganciclovir, acyclovir (IS) and 1-heptanesulfonic acid.

Figure 2. Representative chromatogram of ganciclovir (GCV) with acyclovir as internal standard (IS) from a renal transplant recipient treated with valganciclovir. Panel A for plasma and panel B for urine.

Figure 3. Mean \pm SD ganciclovir (GCV) concentrations in three solid organ transplant recipients during valganciclovir (VGCV) treatment BID for CMV disease. Open squares are at the 3rd day and closed diamonds are at the 21st day of treatment.

Figure 1.

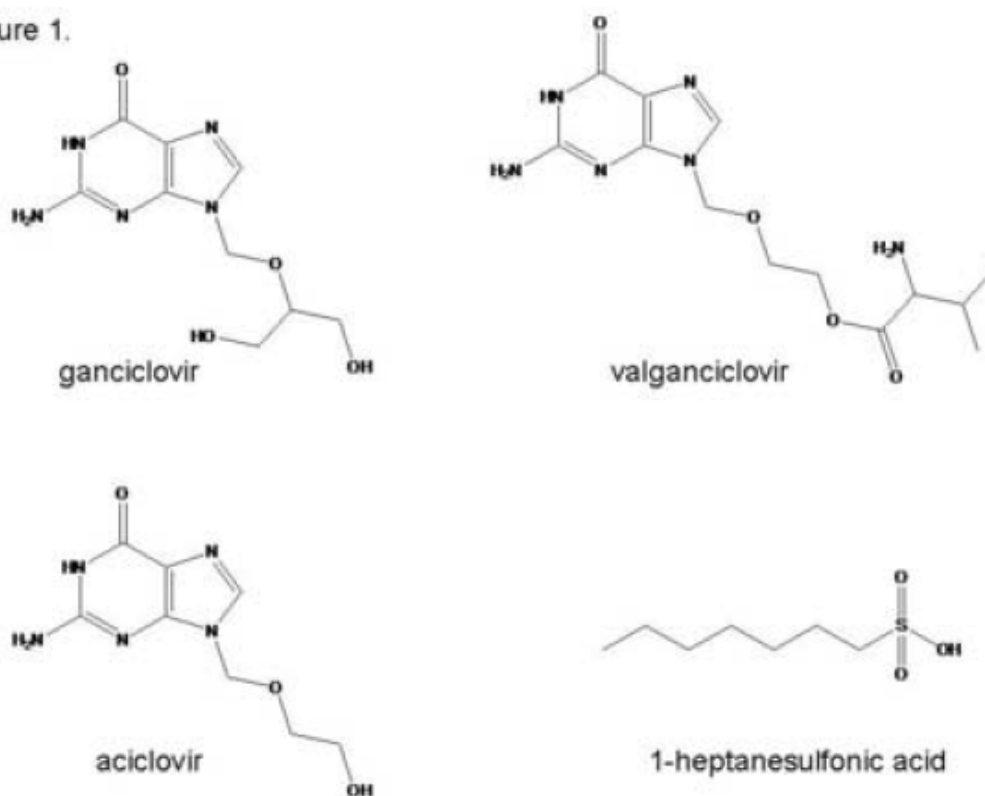


Figure 2.

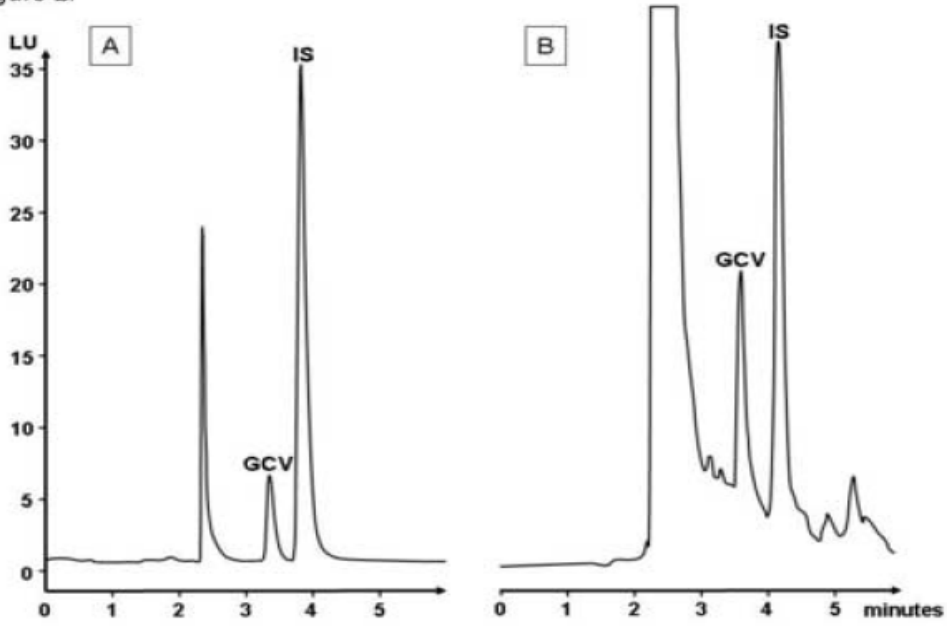
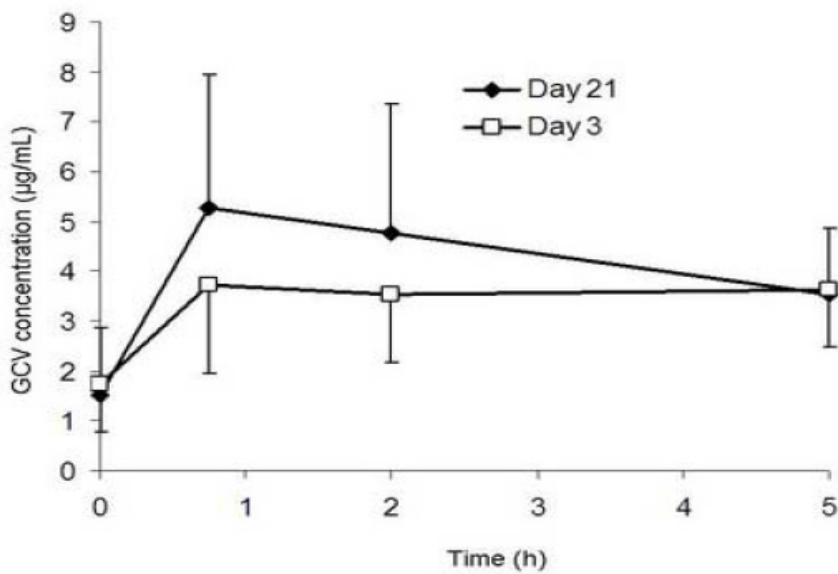


Figure 3.



8.3 Inputfil til bruk i NONMEM

8.3.1 IV-gruppen

#ID	DATE	TIME	AMT	RATE	MDV	CON	GFR	WT	HT	#ID	DATE	TIME	AMT	RATE	MDV	CON	GFR	WT	HT
#1	0	12:00	0	0	0	0.00	1.8	51	148	#11	0	12:00	0	0	0	1.20	4.2	53	168
1	0	08:00	63.75	0	1		1.8	51	148	11	0	20:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	1	08:00	63.75	0	1		1.8	51	148	11	1	08:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	2	08:00	63.75	0	1		1.8	51	148	11	1	20:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	3	07:55	0	0	0	3.35	2.5	52	148	11	2	08:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	3	08:00	65	0	1		2.5	52	148	11	2	20:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	4	08:00	65	0	1		2.5	52	148	11	3	07:55	0	0	0	2.82	3.6	51	168
1	5	08:00	65	0	1		2.5	52	148	11	3	08:00	127.5	0	1		3.6	51	168
1	6	08:00	65	0	1		2.5	52	148	11	3	20:00	127.5	0	1		3.6	51	168
1	7	07:55	0	0	0	4.16	2.6	55	148	11	4	08:00	127.5	0	1		3.6	51	168
1	7	08:00	68.75	0	1		2.6	55	148	11	4	20:00	127.5	0	1		3.6	51	168
1	8	08:00	68.75	0	1		2.6	55	148	11	5	08:00	127.5	0	1		3.6	51	168
1	9	08:00	68.75	0	1		2.6	55	148	11	5	20:00	127.5	0	1		3.6	51	168
1	10	07:55	0	0	0	0.36	2.6	55	148	11	6	08:00	127.5	0	1		3.6	51	168
1	10	08:00	68.75	0	1		2.6	55	148	11	6	20:00	127.5	0	1		3.6	51	168
1	11	08:00	68.75	0	1		2.6	55	148	11	7	07:55	0	0	0	6.86	4.2	53	168
1	12	08:00	68.75	0	1		2.6	55	148	11	7	08:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	13	08:00	68.75	0	1		2.6	55	148	11	7	20:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	14	07:55	0	0	0	0.28	2.7	57	148	11	8	08:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	14	08:00	71.25	0	1		2.7	57	148	11	8	20:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	15	08:00	71.25	0	1		2.7	57	148	11	9	08:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	16	08:00	71.25	0	1		2.7	57	148	11	9	20:00	132.5	0	1		4.2	53	168
1	17	07:55	0	0	0	0.31	2.7	57	148	11	10	07:55	0	0	0	6.49	4.1	52	168
1	17	08:00	142.5	0	1		2.7	57	148	11	10	08:00	130	0	1		4.1	52	168
1	18	08:00	142.5	0	1		2.7	57	148	11	10	20:00	130	0	1		4.1	52	168
1	19	08:00	142.5	0	1		2.7	57	148	11	11	08:00	130	0	1		4.1	52	168
1	20	08:00	142.5	0	1		2.7	57	148	11	11	20:00	130	0	1		4.1	52	168
1	21	07:55	0	0	0	0.37	2.6	55	148	11	12	08:00	130	0	1		4.1	52	168
1	21	08:00	137.5	0	1		2.6	55	148	11	12	20:00	130	0	1		4.1	52	168
1	22	08:00	450	0	1		2.6	55	148	11	13	08:00	130	0	1		4.1	52	168
1	23	08:00	450	0	1		2.6	55	148	11	13	20:00	130	0	1		4.1	52	168
1	24	08:00	450	0	1		2.6	55	148	11	14	07:55	0	0	0	1.65	3.8	53	168
1	25	08:00	450	0	1		2.6	55	148	11	14	08:00	132.5	0	1		3.8	53	168
1	26	08:00	450	0	1		2.6	55	148	11	14	20:00	132.5	0	1		3.8	53	168
1	27	08:00	450	0	1		2.6	55	148	11	15	08:00	132.5	0	1		3.8	53	168
1	28	08:00	450	0	1		1.8	50	148	11	15	20:00	132.5	0	1		3.8	53	168
1	29	08:00	450	0	1		1.8	50	148	11	16	08:00	132.5	0	1		3.8	53	168
1	30	08:00	450	0	1		1.8	50	148	11	16	20:00	132.5	0	1		3.8	53	168
1	31	08:00	450	0	1		1.8	50	148	11	17	08:00	132.5	0	1		3.4	53	168
1	32	08:00	450	0	1		1.8	50	148	11	17	20:00	132.5	0	1		3.4	53	168
1	33	08:00	450	0	1		1.8	50	148	11	18	08:00	132.5	0	1		3.4	53	168
1	34	08:00	450	0	1		1.8	50	148	11	18	20:00	132.5	0	1		3.4	53	168
1	35	08:00	450	0	1		1.2	49	148	11	19	08:00	132.5	0	1		3.4	53	168
1	36	08:00	450	0	1		1.2	49	148	11	19	20:00	132.5	0	1		3.4	53	168
1	37	08:00	450	0	1		1.2	49	148	11	20	08:00	132.5	0	1		3.4	53	168
1	38	08:00	450	0	1		1.2	49	148	11	20	20:00	132.5	0	1		3.4	53	168
1	39	08:00	450	0	1		1.2	49	148	11	21	07:55	0	0	0	5.88	3.8	53	168
1	40	08:00	450	0	1		1.2	49	148	11	21	08:00	132.5	0	1		3.8	53	168
1	41	08:00	450	0	1		1.2	49	148	11	21	20:00	132.5	0	1		3.8	53	168
1	42	07:55	0	0	0	0.64	1.7	48	148	11	22	08:00	900	0	1		3.8	53	168
1	42	08:00	450	0	1		1.7	48	148	11	23	08:00	900	0	1		3.8	53	168
1	43	08:00	450	0	1		1.7	48	148	11	24	08:00	900	0	1		3.8	53	168
1	44	08:00	450	0	1		1.7	48	148	11	25	08:00	900	0	1		3.8	53	168
1	45	08:00	450	0	1		1.7	48	148	11	26	08:00	900	0	1		3.8	53	168

1	46	08:00	450	0	1		1.7	48	148	11	27	08:00	900	0	1		3.8	53	168
1	47	08:00	450	0	1		1.7	48	148	11	28	07:55	0	0	0	4.61	3.8	54	168
1	48	08:00	450	0	1		1.7	48	148	11	28	08:00	900	0	1		3.8	54	168
1	49	07:55	0	0	0	2.86	1.7	48	148	11	29	08:00	900	0	1		3.8	54	168
1	49	08:00	450	0	1		1.7	48	148	11	30	08:00	900	0	1		3.8	54	168
#2	0	12:00	0	0	0	0.00	3.8	100	180	11	31	08:00	900	0	1		3.8	54	168
2	0	08:00	250	0	1		3.8	100	180	11	32	08:00	900	0	1		3.8	54	168
2	1	08:00	250	0	1		3.8	100	180	11	33	08:00	900	0	1		3.8	54	168
2	2	08:00	250	0	1		3.8	100	180	11	34	08:00	900	0	1		3.8	54	168
2	3	07:55	0	0	0	2.98	4.1	103	180	11	35	07:55	0	0	0	2.99	4.9	55	168
2	3	08:00	257.5	0	1		4.1	103	180	11	35	08:00	900	0	1		4.9	55	168
2	4	08:00	257.5	0	1		4.1	103	180	11	36	08:00	900	0	1		4.9	55	168
2	5	08:00	257.5	0	1		4.1	103	180	11	37	08:00	900	0	1		4.9	55	168
2	6	08:00	257.5	0	1		4.1	103	180	11	38	08:00	900	0	1		4.9	55	168
2	7	07:55	0	0	0	2.36	5.1	109	180	11	39	08:00	900	0	1		4.9	55	168
2	7	08:00	545	0	1		5.1	109	180	11	40	08:00	900	0	1		4.9	55	168
2	8	08:00	545	0	1		5.1	109	180	11	41	08:00	900	0	1		4.9	55	168
2	9	08:00	545	0	1		5.1	109	180	11	42	08:00	900	0	1		4.5	57	168
2	10	07:55	0	0	0	77.96	5.8	109	180	11	43	08:00	900	0	1		4.5	57	168
2	10	08:00	545	0	1		5.8	109	180	11	44	08:00	900	0	1		4.5	57	168
2	11	08:00	545	0	1		5.8	109	180	11	45	08:00	900	0	1		4.5	57	168
2	12	08:00	545	0	1		5.8	109	180	11	46	08:00	900	0	1		4.5	57	168
2	13	08:00	545	0	1		5.8	109	180	11	47	08:00	900	0	1		4.5	57	168
2	14	07:55	0	0	0	8.01	5.4	109	180	11	48	08:00	900	0	1		4.5	57	168
2	14	08:00	545	0	1		5.4	109	180	11	49	07:55	0	0	0	1.85	4.5	57	168
2	15	08:00	545	0	1		5.4	109	180	11	49	08:00	900	0	1		4.5	57	168
2	16	08:00	545	0	1		5.4	109	180	#12	0	12:00	0	0	0		2.7	79	165
2	17	07:55	0	0	0	4.14	5.6	107	180	12	0	08:00	197.5	0	1		2.7	79	165
2	17	08:00	535	0	1		5.6	107	180	12	1	08:00	197.5	0	1		2.7	79	165
2	18	08:00	535	0	1		5.6	107	180	12	2	08:00	197.5	0	1		2.7	79	165
2	19	08:00	535	0	1		5.6	107	180	12	3	08:00	200	0	1		2.6	80	165
2	20	08:00	535	0	1		5.6	107	180	12	4	08:00	200	0	1		2.6	80	165
2	21	07:55	0	0	0	4.25	5.2	106	180	12	5	08:00	200	0	1		2.6	80	165
2	21	08:00	530	0	1		5.2	106	180	12	6	08:00	200	0	1		2.6	80	165
2	22	08:00	900	0	1		5.2	106	180	12	7	08:00	202.5	0	1		2.7	81	165
2	23	08:00	900	0	1		5.2	106	180	12	8	08:00	202.5	0	1		2.7	81	165
2	24	08:00	900	0	1		5.2	106	180	12	9	08:00	202.5	0	1		2.7	81	165
2	25	08:00	900	0	1		5.2	106	180	12	10	08:00	202.5	0	1		2.8	81	165
2	26	08:00	900	0	1		5.2	106	180	12	11	08:00	202.5	0	1		2.8	81	165
2	27	08:00	900	0	1		5.2	106	180	12	12	08:00	202.5	0	1		2.8	81	165
2	28	07:55	0	0	0	5.83	4.9	105	180	12	13	08:00	202.5	0	1		2.8	81	165
2	28	08:00	900	0	1		4.9	105	180	12	14	08:00	202.5	0	1		2.8	81	165
2	29	08:00	900	0	1		4.9	105	180	12	15	08:00	202.5	0	1		2.8	81	165
2	30	08:00	900	0	1		4.9	105	180	12	16	08:00	202.5	0	1		2.8	81	165
2	31	08:00	900	0	1		4.9	105	180	12	17	07:55	0	0	0	0.66	2.5	80	165
2	32	08:00	900	0	1		4.9	105	180	12	17	08:00	200	0	1		2.5	80	165
2	33	08:00	900	0	1		4.9	105	180	12	18	08:00	200	0	1		2.5	80	165
2	34	08:00	900	0	1		4.9	105	180	12	19	08:00	200	0	1		2.5	80	165
2	35	07:55	0	0	0	2.81	5.5	105	180	12	20	08:00	200	0	1		2.5	80	165
2	35	08:00	900	0	1		5.5	105	180	12	21	07:55	0	0	0	2.41	2.4	81	165
2	36	08:00	900	0	1		5.5	105	180	12	21	08:00	202.5	0	1		2.4	81	165
2	37	08:00	900	0	1		5.5	105	180	12	22	08:00	450	0	1		2.4	81	165
2	38	08:00	900	0	1		5.5	105	180	12	23	08:00	450	0	1		2.4	81	165
2	39	08:00	900	0	1		5.5	105	180	12	24	08:00	450	0	1		2.4	81	165
2	40	08:00	900	0	1		5.5	105	180	12	25	08:00	450	0	1		2.4	81	165
2	41	08:00	900	0	1		5.5	105	180	12	26	08:00	450	0	1		2.4	81	165
2	42	07:55	0	0	0	2.42	6.3	104	180	12	27	08:00	450	0	1		2.4	81	165
2	42	08:00	900	0	1		6.3	104	180	12	28	08:00	450	0	1		2.7	83	165
2	43	08:00	900	0	1		6.3	104	180	12	29	08:00	450	0	1		2.7	83	165

2	44	08:00	900	0	1	6.3	104	180	12	30	08:00	450	0	1	2.7	83	165	
2	45	08:00	900	0	1	6.3	104	180	12	31	08:00	450	0	1	2.7	83	165	
2	46	08:00	900	0	1	6.3	104	180	12	32	08:00	450	0	1	2.7	83	165	
2	47	08:00	900	0	1	6.3	104	180	12	33	08:00	450	0	1	2.7	83	165	
2	48	08:00	900	0	1	6.3	104	180	12	34	08:00	450	0	1	2.7	83	165	
2	49	07:55	0	0	2.49	6.3	104	180	12	35	07:55	0	0	0	0.90	2.4	83	165
2	49	08:00	900	1		6.3	104	180	12	35	08:00	450	0	1		2.4	83	165
#3	0	12:00	0	0	0.00	2.6	62	170	12	36	08:00	450	0	1		2.4	83	165
3	0	08:00	155	1		2.6	62	170	12	37	08:00	450	0	1		2.4	83	165
3	1	08:00	155	1		2.6	62	170	12	38	08:00	450	0	1		2.4	83	165
3	2	08:00	155	1		2.6	62	170	12	39	08:00	450	0	1		2.4	83	165
3	3	07:55	0	0	0.50	2.7	62	170	12	40	08:00	450	0	1		2.4	83	165
3	3	08:00	155	1		2.7	62	170	12	41	08:00	450	0	1		2.4	83	165
3	4	08:00	155	1		2.7	62	170	12	42	07:55	0	0	0	3.26	2.7	83	165
3	5	08:00	155	1		2.7	62	170	12	42	08:00	450	0	1		2.7	83	165
3	6	08:00	155	1		2.7	62	170	12	43	08:00	450	0	1		2.7	83	165
3	7	07:55	0	0	0.47	2.7	61	170	12	44	08:00	450	0	1		2.7	83	165
3	7	08:00	152.5	1		2.7	61	170	12	45	08:00	450	0	1		2.7	83	165
3	8	08:00	152.5	1		2.7	61	170	12	46	08:00	450	0	1		2.7	83	165
3	9	08:00	152.5	1		2.7	61	170	12	47	08:00	450	0	1		2.7	83	165
3	10	07:55	0	0	0.64	2.4	60	170	12	48	08:00	450	0	1		2.7	83	165
3	10	08:00	150	1		2.4	60	170	12	49	07:55	0	0	0	1.48	2.7	83	165
3	11	08:00	150	1		2.4	60	170	12	49	08:00	450	0	1		2.7	83	165
3	12	08:00	150	1		2.4	60	170	#13	0	12:00	0	0	0	0.00	3.6	70	155
3	13	08:00	150	1		2.4	60	170	13	0	20:00	350	0	1		3.6	70	155
3	14	07:55	0	0	0.67	2.7	60	170	13	1	08:00	350	0	1		3.6	70	155
3	14	08:00	150	1		2.7	60	170	13	1	20:00	350	0	1		3.6	70	155
3	15	08:00	150	1		2.7	60	170	13	2	08:00	350	0	1		3.6	70	155
3	16	08:00	150	1		2.7	60	170	13	2	20:00	350	0	1		3.6	70	155
3	17	07:55	0	0	0.66	2.4	60	170	13	3	07:55	0	0	0	9.64	4.0	71	155
3	17	08:00	150	1		2.4	60	170	13	3	08:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	18	08:00	150	1		2.4	60	170	13	3	20:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	19	08:00	150	1		2.4	60	170	13	4	08:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	20	08:00	150	1		2.4	60	170	13	4	20:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	21	07:55	0	0	0.92	2.3	60	170	13	5	08:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	21	08:00	150	1		2.3	60	170	13	5	20:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	22	08:00	450	1		2.3	60	170	13	6	08:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	23	08:00	450	1		2.3	60	170	13	6	20:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	24	08:00	450	1		2.3	60	170	13	7	07:55	0	0	0	1.44	3.9	70	155
3	25	08:00	450	1		2.3	60	170	13	7	08:00	175	0	1		3.9	70	155
3	26	08:00	450	1		2.3	60	170	13	7	20:00	175	0	1		3.9	70	155
3	27	08:00	450	1		2.3	60	170	13	8	08:00	175	0	1		3.9	70	155
3	28	07:55	0	0	2.58	2.2	61	170	13	8	20:00	175	0	1		3.9	70	155
3	28	08:00	450	1		2.2	61	170	13	9	08:00	175	0	1		3.9	70	155
3	29	08:00	450	1		2.2	61	170	13	9	20:00	175	0	1		3.9	70	155
3	30	08:00	450	1		2.2	61	170	13	10	07:55	0	0	0	0.51	4.0	71	155
3	31	08:00	450	1		2.2	61	170	13	10	08:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	32	08:00	450	1		2.2	61	170	13	10	20:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	33	08:00	450	1		2.2	61	170	13	11	08:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	34	08:00	450	1		2.2	61	170	13	11	20:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	35	07:55	0	0	0.93	2.5	61	170	13	12	08:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	35	08:00	450	1		2.5	61	170	13	12	20:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	36	08:00	450	1		2.5	61	170	13	13	08:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	37	08:00	450	1		2.5	61	170	13	13	20:00	177.5	0	1		4.0	71	155
3	38	08:00	450	1		2.5	61	170	13	14	07:55	0	0	0	0.49	3.6	70	155
3	39	08:00	450	1		2.5	61	170	13	14	08:00	175	0	1		3.6	70	155
3	40	08:00	450	1		2.5	61	170	13	14	20:00	175	0	1		3.6	70	155
3	41	08:00	450	1		2.5	61	170	13	15	08:00	175	0	1		3.6	70	155
3	42	07:55	0	0	1.02	2.2	58	170	13	15	20:00	175	0	1		3.6	70	155

3	42	08:00	450	1		2.2	58	170	13	16	08:00	175	0	1		3.6	70	155
3	43	08:00	0	1		2.2	58	170	13	16	20:00	175	0	1		3.6	70	155
3	44	08:00	450	1		2.2	58	170	13	17	07:55	0	0	0	6.17	3.9	70	155
3	45	08:00	0	1		2.2	58	170	13	17	08:00	175	0	1		3.9	70	155
3	46	08:00	450	1		2.2	58	170	13	17	20:00	175	0	1		3.9	70	155
3	47	08:00	0	1		2.2	58	170	13	18	08:00	175	0	1		3.9	70	155
3	48	08:00	450	1		2.2	58	170	13	18	20:00	175	0	1		3.9	70	155
3	49	07:55	0	0	0.06	2.2	58	170	13	19	08:00	175	0	1		3.9	70	155
3	49	08:00	0	1		2.2	58	170	13	19	20:00	175	0	1		3.9	70	155
#4	0	12:00	0	0		1.0	47	155	13	20	08:00	175	0	1		3.9	70	155
4	0	20:00	117.5	1		1.0	47	155	13	20	20:00	175	0	1		3.9	70	155
4	1	08:00	117.5	1		1.0	47	155	13	21	07:55	0	0	0	2.79	4.4	70	155
4	1	20:00	117.5	1		1.0	47	155	13	21	08:00	175	0	1		4.4	70	155
4	2	08:00	117.5	1		1.0	47	155	13	21	20:00	175	0	1		4.4	70	155
4	2	20:00	117.5	1		1.0	47	155	13	22	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	3	07:55	0	0	1.18	1.9	49	155	13	23	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	3	08:00	122.5	1		1.9	49	155	13	24	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	3	20:00	122.5	1		1.9	49	155	13	25	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	4	08:00	122.5	1		1.9	49	155	13	26	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	4	20:00	122.5	1		1.9	49	155	13	27	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	5	08:00	122.5	1		1.9	49	155	13	28	07:55	0	0	0	0.22	4.4	70	155
4	5	20:00	122.5	1		1.9	49	155	13	28	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	6	08:00	122.5	1		1.9	49	155	13	29	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	6	20:00	122.5	1		1.9	49	155	13	30	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	7	07:55	0	0	0.26	2.1	49	155	13	31	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	7	08:00	122.5	1		2.1	49	155	13	32	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	7	20:00	122.5	1		2.1	49	155	13	33	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	8	08:00	122.5	1		2.1	49	155	13	34	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	9	20:00	122.5	1		2.1	49	155	13	35	07:55	0	0	0	0.43	3.9	70	155
4	10	07:55	0	0	0.88	1.8	49	155	13	35	08:00	900	0	1		3.9	70	155
4	10	08:00	122.5	1		1.8	49	155	13	36	08:00	900	0	1		3.9	70	155
4	11	08:00	122.5	1		1.8	49	155	13	37	08:00	900	0	1		3.9	70	155
4	12	08:00	122.5	1		1.8	49	155	13	38	08:00	900	0	1		3.9	70	155
4	13	08:00	122.5	1		1.8	49	155	13	39	08:00	900	0	1		3.9	70	155
4	14	07:55	0	0	0.88	1.9	52	155	13	40	08:00	900	0	1		3.9	70	155
4	14	08:00	130	1		1.9	52	155	13	41	08:00	900	0	1		3.9	70	155
4	15	08:00	130	1		1.9	52	155	13	42	07:55	0	0	0	0.31	4.4	70	155
4	16	08:00	130	1		1.9	52	155	13	42	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	17	07:55	0	0	0.98	1.8	51	155	13	43	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	17	08:00	127.5	1		1.8	51	155	13	44	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	18	08:00	127.5	1		1.8	51	155	13	45	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	19	08:00	127.5	1		1.8	51	155	13	46	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	20	08:00	127.5	1		1.8	51	155	13	47	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	21	07:55	0	0	0.72	1.8	50	155	13	48	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	21	08:00	125	1		1.8	50	155	13	49	07:55	0	0	0	0.42	4.4	70	155
4	23	08:00	450	1		1.8	50	155	13	49	08:00	900	0	1		4.4	70	155
4	25	08:00	450	1		1.8	50	155	#14	0	08:00	107.5	0	1		1.8	43	149
4	27	08:00	450	1		1.8	50	155	14	1	08:00	107.5	0	1		1.8	43	149
4	28	07:55	0	0	0.84	1.9	51	155	14	2	08:00	107.5	0	1		1.8	43	149
4	29	08:00	450	0		1.9	51	155	14	3	07:55	0	0	0	0.48	2.2	43	149
4	31	08:00	450	1		1.9	51	155	14	3	08:00	107.5	0	1		2.2	43	149
4	33	08:00	450	1		1.9	51	155	14	4	08:00	107.5	0	1		2.2	43	149
4	35	07:55	0	0	0.92	1.7	51	155	14	5	08:00	107.5	0	1		2.2	43	149
4	35	08:00	450	1		1.7	51	155	14	6	08:00	107.5	0	1		2.2	43	149
4	37	08:00	450	1		1.7	51	155	14	7	08:00	103	0	1		2.7	41	149
4	39	08:00	450	1		1.7	51	155	14	8	08:00	103	0	1		2.7	41	149
4	41	08:00	450	1		1.7	51	155	14	9	08:00	103	0	1		2.7	41	149
4	42	07:55	0	0	0.47	2.2	52	155	14	10	07:55	0	0	0	0.12	3.5	41	149
4	43	08:00	450	1		2.2	52	155	14	10	08:00	101.25	0	1		3.5	41	149

4	45	08:00	450	1		2.2	52	155	14	10	20:00	101.25	0	1		3.5	41	149
4	47	08:00	450	1		2.2	52	155	14	11	08:00	101.25	0	1		3.5	41	149
4	49	07:55	0	0	0.22	2.2	52	155	14	11	20:00	101.25	0	1		3.5	41	149
4	49	08:00	450	1		2.3	52	155	14	12	08:00	101.25	0	1		3.5	41	149
#5	0	12:00	0	0	0.08	3.4	63	173	14	12	20:00	101.25	0	1		3.5	41	149
5	0	20:00	157.5	1		3.4	63	173	14	13	08:00	101.25	0	1		3.5	41	149
5	1	08:00	157.5	1		3.4	63	173	14	13	20:00	101.25	0	1		3.5	41	149
5	1	20:00	157.5	1		3.4	63	173	14	14	07:55	0	0	0	1.72	4.7	39	149
5	2	08:00	157.5	1		3.4	63	173	14	14	08:00	96.25	0	1		4.7	39	149
5	2	20:00	157.5	1		3.4	63	173	14	14	20:00	96.25	0	1		4.7	39	149
5	3	07:55	0	1	0.72	3.3	62	173	14	14	08:00	96.25	0	1		4.7	39	149
5	3	08:00	155	1		3.3	62	173	14	15	20:00	96.25	0	1		4.7	39	149
5	3	20:00	155	1		3.3	62	173	14	16	08:00	96.25	0	1		4.7	39	149
5	4	08:00	155	1		3.3	62	173	14	16	20:00	96.25	0	1		4.7	39	149
5	4	20:00	155	1		3.3	62	173	14	17	07:55	0	0	0	0.32	5.6	39	149
5	5	08:00	155	1		3.3	62	173	14	17	08:00	195	0	1		5.6	39	149
5	5	20:00	155	1		3.3	62	173	14	17	20:00	195	0	1		5.6	39	149
5	6	08:00	155	1		3.3	62	173	14	18	08:00	195	0	1		5.6	39	149
5	6	20:00	155	1		3.3	62	173	14	18	20:00	195	0	1		5.6	39	149
5	7	07:55	0	0	0.73	3.3	62	173	14	19	08:00	195	0	1		5.6	39	149
5	7	08:00	155	1		3.3	62	173	14	19	20:00	195	0	1		5.6	39	149
5	7	20:00	155	1		3.3	62	173	14	20	08:00	195	0	1		5.6	39	149
5	8	08:00	155	1		3.3	62	173	14	20	20:00	195	0	1		5.6	39	149
5	8	20:00	155	1		3.3	62	173	14	21	07:55	0	0	0	0.55	4.8	39	149
5	9	08:00	155	1		3.3	62	173	14	21	08:00	195	0	1		4.8	39	149
5	9	20:00	155	1		3.3	62	173	14	21	20:00	195	0	1		4.8	39	149
5	10	07:55	0	0	0.88	3.6	61	173	14	22	08:00	900	0	1		4.8	39	149
5	10	08:00	152.5	1		3.6	61	173	14	23	08:00	900	0	1		4.8	39	149
5	10	20:00	152.5	1		3.6	61	173	14	24	08:00	900	0	1		4.8	39	149
5	11	08:00	152.5	1		3.6	61	173	14	25	08:00	900	0	1		4.8	39	149
5	11	20:00	152.5	1		3.6	61	173	14	26	08:00	900	0	1		4.8	39	149
5	12	08:00	152.5	1		3.6	61	173	14	27	08:00	900	0	1		4.8	39	149
5	12	20:00	152.5	1		3.6	61	173	14	28	07:55	0	0	0	1.25	3.9	37	149
5	13	08:00	152.5	1		3.6	61	173	14	28	08:00	900	0	1		3.9	37	149
5	13	20:00	152.5	1		3.6	61	173	14	29	08:00	900	0	1		3.9	37	149
5	14	07:55	0	0	0.88	3.6	61	173	14	30	08:00	900	0	1		3.9	37	149
5	14	08:00	152.5	1		3.6	61	173	14	31	08:00	900	0	1		3.9	37	149
5	14	20:00	152.5	1		3.6	61	173	14	32	08:00	900	0	1		3.9	37	149
5	15	08:00	152.5	1		3.6	61	173	14	33	08:00	900	0	1		3.9	37	149
5	15	20:00	152.5	1		3.6	61	173	14	34	08:00	900	0	1		3.9	37	149
5	16	08:00	152.5	1		3.6	61	173	14	35	07:55	0	0	0	0.36	2.5	35	149
5	16	20:00	152.5	1		3.6	61	173	14	35	08:00	900	0	1		2.5	35	149
5	17	07:55	0	0	1.01	3.9	62	173	14	36	08:00	900	0	1		2.5	35	149
5	17	08:00	155	1		3.9	62	173	14	37	08:00	900	0	1		2.5	35	149
5	17	20:00	155	1		3.9	62	173	14	38	08:00	900	0	1		2.5	35	149
5	18	08:00	155	1		3.9	62	173	14	39	08:00	900	0	1		2.5	35	149
5	18	20:00	155	1		3.9	62	173	14	40	08:00	900	0	1		2.5	35	149
5	19	08:00	155	1		3.9	62	173	14	41	08:00	900	0	1		2.5	35	149
5	19	20:00	155	1		3.9	62	173	14	42	08:00	900	0	1		2.6	34	149
5	20	08:00	155	1		3.9	62	173	14	43	08:00	900	0	1		2.6	34	149
5	20	20:00	155	1		3.9	62	173	14	44	08:00	900	0	1		2.6	34	149
5	21	07:55	0	0	1.00	3.9	62	173	14	45	08:00	900	0	1		2.6	34	149
5	21	08:00	155	1		3.9	62	173	14	46	08:00	900	0	1		2.6	34	149
5	21	20:00	155	1		3.9	62	173	14	47	08:00	900	0	1		2.6	34	149
5	22	08:00	900	1		3.9	62	173	14	48	08:00	900	0	1		2.6	34	149
5	23	08:00	900	1		3.9	62	173	14	49	08:00	900	0	1		2.6	34	149
5	24	08:00	900	1		3.9	62	173	#15	0	12:00	0	0	0	0.00	1.1	56	166
5	25	08:00	900	1		3.9	62	173	15	0	08:00	70	0	1		1.1	56	166
5	26	08:00	900	1		3.9	62	173	15	1	08:00	70	0	1		1.1	56	166

5	27	08:00	900	1		3.9	62	173	15	2	08:00	70	0	1		1.1	56	166
5	28	07:55	0	0	0.71	4.0	63	173	15	3	07:55	0	0	0	0.49	1.6	56	166
5	28	08:00	900	1		4.0	63	173	15	3	08:00	140	0	1		1.6	56	166
5	29	08:00	900	1		4.0	63	173	15	4	08:00	140	0	1		1.6	56	166
5	30	08:00	900	1		4.0	63	173	15	5	08:00	140	0	1		1.6	56	166
5	31	08:00	900	1		4.0	63	173	15	6	08:00	140	0	1		1.6	56	166
5	32	08:00	900	1		4.0	63	173	15	7	07:55	0	0	0	0.47	1.6	56	166
5	33	08:00	900	1		4.0	63	173	15	7	08:00	140	0	1		1.6	56	166
5	34	08:00	900	1		4.0	63	173	15	8	08:00	140	0	1		1.6	56	166
5	35	07:55	0	0	0.40	4.1	65	173	15	9	08:00	140	0	1		1.6	56	166
5	35	08:00	900	1		4.1	65	173	15	10	07:55	0	0	0	0.54	2.0	58	166
5	36	08:00	900	1		4.1	65	173	15	10	08:00	145	0	1		2.0	58	166
5	37	08:00	900	1		4.1	65	173	15	11	08:00	145	0	1		2.0	58	166
5	38	08:00	900	1		4.1	65	173	15	12	08:00	145	0	1		2.0	58	166
5	39	08:00	900	1		4.1	65	173	15	13	08:00	145	0	1		2.0	58	166
5	40	08:00	900	1		4.1	65	173	15	14	07:55	0	0	0	0.38	2.0	58	166
5	41	08:00	900	1		4.1	65	173	15	14	08:00	145	0	1		2.0	58	166
5	42	07:55	0	0	0.43	4.1	64	173	15	15	08:00	145	0	1		2.0	58	166
5	42	08:00	900	1		4.1	64	173	15	16	08:00	145	0	1		2.0	58	166
5	43	08:00	900	1		4.1	64	173	15	17	07:55	145	0	1	0.43	2.2	58	166
5	44	08:00	900	1		4.1	64	173	15	17	08:00	145	0	1		2.2	58	166
5	45	08:00	900	1		4.1	64	173	15	18	08:00	145	0	1		2.2	58	166
5	46	08:00	900	1		4.1	64	173	15	19	08:00	145	0	1		2.2	58	166
5	47	08:00	900	1		4.1	64	173	15	20	08:00	145	0	1		2.2	58	166
5	48	08:00	900	1		4.1	64	173	15	21	08:00	152.5	0	1		2.5	61	166
5	49	07:55	0	0	0.37	4.1	64	173	15	22	08:00	450	0	1		2.5	61	166
5	49	08:00	900	1		4.1	64	173	15	23	08:00	450	0	1		2.5	61	166
#6	0	12:00	0	0	0.09	2.0	52	175	15	24	08:00	450	0	1		2.5	61	166
6	0	08:00	130	1		2.0	52	175	15	25	08:00	450	0	1		2.5	61	166
6	1	08:00	130	1		2.0	52	175	15	26	08:00	450	0	1		2.5	61	166
6	2	08:00	130	1		2.0	52	175	15	27	08:00	450	0	1		2.5	61	166
6	3	07:55	0	0	1.01	2.0	52	175	15	28	07:55	0	0	0	0.54	2.6	61	166
6	3	08:00	130	1		2.0	52	175	15	28	08:00	450	0	1		2.6	61	166
6	4	08:00	130	1		2.0	52	175	15	29	08:00	450	0	1		2.6	61	166
6	5	08:00	130	1		2.0	52	175	15	30	08:00	450	0	1		2.6	61	166
6	6	08:00	130	1		2.0	52	175	15	31	08:00	450	0	1		2.6	61	166
6	7	07:55	0	0	0.91	2.5	52	175	15	32	08:00	450	0	1		2.6	61	166
6	7	08:00	130	1		2.5	52	175	15	33	08:00	450	0	1		2.6	61	166
6	8	08:00	130	1		2.5	52	175	15	34	08:00	450	0	1		2.6	61	166
6	9	08:00	130	1		2.5	52	175	15	35	07:55	0	0	0	0.70	2.2	64	166
6	10	07:55	0	0	0.85	2.5	53	175	15	35	08:00	450	0	1		2.2	64	166
6	10	08:00	132.5	1		2.5	53	175	15	36	08:00	450	0	1		2.2	64	166
6	11	08:00	132.5	1		2.5	53	175	15	37	08:00	450	0	1		2.2	64	166
6	12	08:00	132.5	1		2.5	53	175	15	38	08:00	450	0	1		2.2	64	166
6	13	08:00	132.5	1		2.5	53	175	15	39	08:00	450	0	1		2.2	64	166
6	14	07:55	0	0	0.75	2.6	54	175	15	40	08:00	450	0	1		2.2	64	166
6	14	08:00	135	1		2.6	54	175	15	41	08:00	450	0	1		2.2	64	166
6	15	08:00	135	1		2.6	54	175	15	42	07:55	0	0	0	0.31	2.0	60	166
6	16	08:00	135	1		2.6	54	175	15	42	08:00	450	0	1		2.0	60	166
6	17	07:55	0	0	0.81	2.6	54	175	15	43	08:00	450	0	1		2.0	60	166
6	17	08:00	135	1		2.6	54	175	15	44	08:00	450	0	1		2.0	60	166
6	18	08:00	135	1		2.6	54	175	15	45	08:00	450	0	1		2.0	60	166
6	19	08:00	135	1		2.6	54	175	15	46	08:00	450	0	1		2.0	60	166
6	20	08:00	135	1		2.6	54	175	15	47	08:00	450	0	1		2.0	60	166
6	21	07:55	0	0	0.50	2.6	54	175	15	48	08:00	450	0	1		2.0	60	166
6	21	08:00	135	1		2.1	54	175	15	49	07:55	0	0	0	1.27	2.0	60	166
6	22	08:00	450	1		2.1	54	175	15	49	08:00	450	0	1		2.0	60	166
6	23	08:00	450	1		2.1	54	175	#16	0	12:00	0	0	0	0.00	3.2	101	187
6	24	08:00	450	1		2.1	54	175	16	0	20:00	252.5	0	1		3.2	101	187

6	25	08:00	450	1		2.1	54	175	16	1	08:00	252.5	0	1		3.2	101	187
6	26	08:00	450	1		2.1	54	175	16	1	20:00	252.5	0	1		3.2	101	187
6	27	08:00	450	1		2.1	54	175	16	2	08:00	252.5	0	1		3.2	101	187
6	28	07:55	0	0	2.17	1.9	54	175	16	2	20:00	252.5	0	1		3.2	101	187
6	28	08:00	450	1		1.9	54	175	16	3	07:55	0	0	0	2.96	3.3	101	187
6	29	08:00	450	1		1.9	54	175	16	3	08:00	252.5	0	1		3.3	101	187
6	30	08:00	450	1		1.9	54	175	16	3	20:00	252.5	0	1		3.3	101	187
6	31	08:00	450	1		1.9	54	175	16	4	08:00	252.5	0	1		3.3	101	187
6	32	08:00	450	1		1.9	54	175	16	4	20:00	252.5	0	1		3.3	101	187
6	33	08:00	450	1		1.9	54	175	16	5	08:00	252.5	0	1		3.3	101	187
6	34	08:00	450	1		1.9	54	175	16	5	20:00	252.5	0	1		3.3	101	187
6	35	07:55	0	0	1.27	1.9	54	175	16	6	08:00	252.5	0	1		3.3	101	187
6	35	08:00	450	1		1.9	54	175	16	6	20:00	252.5	0	1		3.3	101	187
6	36	08:00	450	1		1.9	54	175	16	7	07:55	0	0	0	12.7	1.5	101	187
6	37	08:00	450	1		1.9	54	175	16	7	08:00	252.5	0	1		1.5	101	187
6	38	08:00	450	1		1.9	54	175	16	7	20:00	252.5	0	1		1.5	101	187
6	39	08:00	450	1		1.9	54	175	16	8	08:00	252.5	0	1		1.5	101	187
6	40	08:00	450	1		1.9	54	175	16	8	20:00	252.5	0	1		1.5	101	187
6	41	08:00	450	1		1.9	54	175	16	9	08:00	252.5	0	1		1.5	101	187
6	42	07:55	0	0	1.90	2.0	53	175	16	9	20:00	252.5	0	1		1.5	101	187
6	42	08:00	450	1		2.0	53	175	16	10	07:55	0	0	0	10.6	1.7	101	187
6	43	08:00	450	1		2.0	53	175	16	10	08:00	252.5	0	1		1.7	101	187
6	44	08:00	450	1		2.0	53	175	16	10	20:00	252.5	0	1		1.7	101	187
6	46	08:00	450	1		2.0	53	175	16	11	08:00	252.5	0	1		1.7	101	187
6	46	08:00	450	1		2.0	53	175	16	11	20:00	252.5	0	1		1.7	101	187
6	47	08:00	450	1		2.0	53	175	16	12	08:00	252.5	0	1		1.7	101	187
6	48	08:00	450	1		2.0	53	175	16	12	20:00	252.5	0	1		1.7	101	187
6	49	07:55	0	0	0.46	2.0	53	175	16	13	08:00	252.5	0	1		1.7	101	187
6	49	08:00	450	1		2.0	53	175	16	13	20:00	252.5	0	1		1.7	101	187
#7	0	12:00	0	0	0.02	6.8	74	178	16	14	07:55	0	0	0	1.71	2.4	98	187
7	0	20:00	370	1		6.8	74	178	16	14	08:00	245	0	1		2.4	98	187
7	1	08:00	370	1		6.8	74	178	16	15	08:00	245	0	1		2.4	98	187
7	1	20:00	370	1		6.8	74	178	16	16	08:00	245	0	1		2.4	98	187
7	2	08:00	370	1		6.8	74	178	16	17	07:55	245	0	1	1.39	2.5	98	187
7	2	20:00	370	1		6.8	74	178	16	17	08:00	245	0	1		2.5	98	187
7	3	07:55	0	0	1.05	6.1	74	178	16	18	08:00	245	0	1		2.5	98	187
7	3	08:00	370	1		6.1	74	178	16	19	08:00	245	0	1		2.5	98	187
7	3	20:00	370	1		6.1	74	178	16	20	08:00	245	0	1		2.5	98	187
7	4	08:00	370	1		6.1	74	178	16	21	07:55	0	0	0	2.77	2.4	98	187
7	4	20:00	370	1		6.1	74	178	16	21	08:00	245	0	1		2.4	98	187
7	5	08:00	370	1		6.1	74	178	16	22	08:00	450	0	1		2.4	98	187
7	5	20:00	370	1		6.1	74	178	16	23	08:00	450	0	1		2.4	98	187
7	6	08:00	370	1		6.1	74	178	16	24	08:00	450	0	1		2.4	98	187
7	6	20:00	370	1		6.1	74	178	16	25	08:00	450	0	1		2.4	98	187
7	7	07:55	0	0	1.03	7.0	75	178	16	26	08:00	450	0	1		2.4	98	187
7	7	08:00	375	1		7.0	75	178	16	27	08:00	450	0	1		2.4	98	187
7	7	20:00	375	1		7.0	75	178	16	28	07:55	0	0	0	1.55	2.4	97	187
7	8	08:00	375	1		7.0	75	178	16	28	08:00	450	0	1		2.4	97	187
7	8	20:00	375	1		7.0	75	178	16	29	08:00	450	0	1		2.4	97	187
7	9	08:00	375	1		7.0	75	178	16	30	08:00	450	0	1		2.4	97	187
7	9	20:00	375	1		7.0	75	178	16	31	08:00	450	0	1		2.4	97	187
7	10	07:55	0	0	0.74	6.8	76	178	16	32	08:00	450	0	1		2.4	97	187
7	10	08:00	380	1		6.8	76	178	16	33	08:00	450	0	1		2.4	97	187
7	10	20:00	380	1		6.8	76	178	16	34	08:00	450	0	1		2.4	97	187
7	11	08:00	380	1		6.8	76	178	16	35	07:55	0	0	0	1.79	2.4	99	187
7	11	20:00	380	1		6.8	76	178	16	35	08:00	450	0	1		2.4	99	187
7	12	08:00	380	1		6.8	76	178	16	36	08:00	450	0	1		2.4	99	187
7	12	20:00	380	1		6.8	76	178	16	37	08:00	450	0	1		2.4	99	187
7	13	08:00	380	1		6.8	76	178	16	38	08:00	450	0	1		2.4	99	187

7	13	20:00	380	1		6.8	76	178	16	39	08:00	450	0	1		2.4	99	187
7	14	07:55	0	0	1.24	6.9	76	178	16	40	08:00	450	0	1		2.4	99	187
7	14	08:00	380	1		6.9	76	178	16	41	08:00	450	0	1		2.4	99	187
7	14	20:00	380	1		6.9	76	178	16	42	07:55	0	0	0	1.44	3.0	99	187
7	15	08:00	380	1		6.9	76	178	16	42	08:00	450	0	1		3.0	99	187
7	15	20:00	380	1		6.9	76	178	16	43	08:00	450	0	1		3.0	99	187
7	16	08:00	380	1		6.9	76	178	16	44	08:00	450	0	1		3.0	99	187
7	16	20:00	380	1		6.9	76	178	16	45	08:00	450	0	1		3.0	99	187
7	17	07:55	0	0	1.13	7.3	76	178	16	46	08:00	450	0	1		3.0	99	187
7	17	08:00	380	1		7.3	76	178	16	47	08:00	450	0	1		3.0	99	187
7	17	20:00	380	1		7.3	76	178	16	48	08:00	450	0	1		3.0	99	187
7	18	08:00	380	1		7.3	76	178	16	49	07:55	0	0	0	1.72	3.0	99	187
7	18	20:00	380	1		7.3	76	178	16	49	08:00	450	0	1		3.0	99	187
7	19	08:00	380	1		7.3	76	178	#17	0	12:00	0	0	0	0.00	1.8	66	175
7	19	20:00	380	1		7.3	76	178	17	0	08:00	165	0	1		1.8	66	175
7	20	08:00	380	1		7.3	76	178	17	1	08:00	165	0	1		1.8	66	175
7	20	20:00	380	1		7.3	76	178	17	2	08:00	165	0	1		1.8	66	175
7	21	07:55	0	0	1.18	6.9	76	178	17	3	07:55	0	0	0	1.94	2.0	66	175
7	21	08:00	380	1		6.9	76	178	17	3	08:00	165	0	1		2.0	66	175
7	21	20:00	380	1		6.9	76	178	17	4	08:00	165	0	1		2.0	66	175
7	22	08:00	900	1		6.9	76	178	17	5	08:00	165	0	1		2.0	66	175
7	23	08:00	900	1		6.9	76	178	17	6	08:00	165	0	1		2.0	66	175
7	24	08:00	900	1		6.9	76	178	17	7	07:55	0	0	0	1.31	2.3	67	175
7	25	08:00	900	1		6.9	76	178	17	7	08:00	167.5	0	1		2.3	67	175
7	26	08:00	900	1		6.9	76	178	17	8	08:00	167.5	0	1		2.3	67	175
7	27	08:00	900	1		6.9	76	178	17	9	08:00	167.5	0	1		2.3	67	175
7	28	07:55	0	0	0.90	6.7	77	178	17	10	07:55	0	0	0	0.70	2.9	70	175
7	28	08:00	900	1		6.7	77	178	17	10	08:00	175	0	1		2.9	70	175
7	29	08:00	900	1		6.7	77	178	17	11	08:00	175	0	1		2.9	70	175
7	30	08:00	900	1		6.7	77	178	17	12	08:00	175	0	1		2.9	70	175
7	31	08:00	900	1		6.7	77	178	17	13	08:00	175	0	1		2.9	70	175
7	32	08:00	900	1		6.7	77	178	17	14	07:55	0	0	0	0.67	3.3	71	175
7	33	08:00	900	1		6.7	77	178	17	14	08:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	34	08:00	900	1		6.7	77	178	17	14	20:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	35	07:55	0	0	0.66	7.6	79	178	17	15	08:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	35	08:00	900	1		7.6	79	178	17	15	20:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	36	08:00	900	1		7.6	79	178	17	16	08:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	37	08:00	900	1		7.6	79	178	17	16	20:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	38	08:00	900	1		7.6	79	178	17	17	08:00	0	0	0	5.77	3.3	71	175
7	39	08:00	900	1		7.6	79	178	17	17	08:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	40	08:00	900	1		7.6	79	178	17	17	20:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	41	08:00	900	1		7.6	79	178	17	18	08:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	42	08:00	900	1		7.6	79	178	17	18	20:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	43	08:00	900	1		7.6	79	178	17	19	08:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	44	08:00	900	1		7.6	79	178	17	19	20:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	45	08:00	900	1		7.6	79	178	17	20	08:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	46	08:00	900	1		7.6	79	178	17	20	20:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	47	08:00	900	1		7.6	79	178	17	21	07:55	0	0	0	7.86	3.3	71	175
7	48	08:00	900	1		7.6	79	178	17	21	08:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	49	07:55	0	0	0.80	7.6	79	178	17	21	20:00	177.5	0	1		3.3	71	175
7	49	08:00	900	1		7.6	79	178	17	22	08:00	450	0	1		3.3	71	175
#8	0	12:00	0	0	0.00	2.7	66	170	17	23	08:00	450	0	1		3.3	71	175
8	0	08:00	165	1		2.7	66	170	17	24	08:00	450	0	1		3.3	71	175
8	1	08:00	165	1		2.7	66	170	17	25	08:00	450	0	1		3.3	71	175
8	2	08:00	165	1		2.7	66	170	17	26	08:00	450	0	1		3.3	71	175
8	3	07:55	0	0	0.98	2.7	67	170	17	27	08:00	450	0	1		3.3	71	175
8	3	08:00	167.5	1		2.7	67	170	17	28	07:55	0	0	0	1.38	3.6	74	175
8	4	08:00	167.5	1		2.7	67	170	17	28	08:00	900	0	1		3.6	74	175
8	5	08:00	167.5	1		2.7	67	170	17	29	08:00	900	0	1		3.6	74	175

8	6	08:00	167.5	1		2.7	67	170	17	30	08:00	900	0	1		3.6	74	175
8	7	07:55	0	0	0.70	2.8	66	170	17	31	08:00	900	0	1		3.6	74	175
8	7	08:00	165	1		2.8	66	170	17	32	08:00	900	0	1		3.6	74	175
8	8	08:00	165	1		2.8	66	170	17	33	08:00	900	0	1		3.6	74	175
8	9	08:00	165	1		2.8	66	170	17	34	08:00	900	0	1		3.6	74	175
8	10	07:55	0	0	1.40	2.4	64	170	17	35	07:55	0	0	0	2.76	3.3	75	175
8	10	08:00	160	1		2.4	64	170	17	35	08:00	450	0	1		3.3	75	175
8	11	08:00	160	1		2.4	64	170	17	36	08:00	450	0	1		3.3	75	175
8	12	08:00	160	1		2.4	64	170	17	37	08:00	450	0	1		3.3	75	175
8	13	08:00	160	1		2.4	64	170	17	38	08:00	450	0	1		3.3	75	175
8	14	07:55	0	0	0.85	3.1	65	170	17	39	08:00	450	0	1		3.3	75	175
8	14	08:00	162.5	1		3.1	65	170	17	40	08:00	450	0	1		3.3	75	175
8	15	08:00	162.5	1		3.1	65	170	17	41	08:00	450	0	1		3.3	75	175
8	16	08:00	162.5	1		3.1	65	170	17	42	07:55	0	0	0	1.29	3.3	76	175
8	17	07:55	0	0	0.76	3.1	65	170	17	42	08:00	450	0	1		3.3	76	175
8	17	08:00	162.5	1		3.1	65	170	17	43	08:00	450	0	1		3.3	76	175
8	18	08:00	162.5	1		3.1	65	170	17	44	08:00	450	0	1		3.3	76	175
8	19	08:00	162.5	1		3.1	65	170	17	45	08:00	450	0	1		3.3	76	175
8	20	08:00	162.5	1		3.1	65	170	17	46	08:00	450	0	1		3.3	76	175
8	21	07:55	0	0	0.66	3.2	65	170	17	47	08:00	450	0	1		3.3	76	175
8	21	08:00	162.5	1		3.2	65	170	17	48	08:00	450	0	1		3.3	76	175
8	22	08:00	450	1		3.2	65	170	17	49	07:55	0	0	0	0.07	3.3	76	175
8	23	08:00	450	1		3.2	65	170	17	49	08:00	450	0	1		3.3	76	175
8	24	08:00	450	1		3.2	65	170	#18	0	12:00	0	0	0	0.00	3.3	78	180
8	25	08:00	450	1		3.2	65	170	18	0	20:00	195	0	1		3.3	78	180
8	26	08:00	450	1		3.2	65	170	18	1	08:00	195	0	1		3.3	78	180
8	27	08:00	450	1		3.2	65	170	18	1	20:00	195	0	1		3.3	78	180
8	28	07:55	0	0	0.45	3.2	65	170	18	2	08:00	195	0	1		3.3	78	180
8	28	08:00	450	1		3.2	65	170	18	2	20:00	195	0	1		3.3	78	180
8	29	08:00	450	1		3.2	65	170	18	3	07:55	0	0	0	1.25	3.1	77	180
8	30	08:00	450	1		3.2	65	170	18	3	08:00	192.5	0	1		3.1	77	180
8	31	08:00	450	1		3.2	65	170	18	3	20:00	192.5	0	1		3.1	77	180
8	32	08:00	450	1		3.2	65	170	18	4	08:00	192.5	0	1		3.1	77	180
8	33	08:00	450	1		3.2	65	170	18	4	20:00	192.5	0	1		3.1	77	180
8	34	08:00	450	1		3.2	65	170	18	5	08:00	192.5	0	1		3.1	77	180
8	35	07:55	0	0	0.37	3.2	65	170	18	5	20:00	192.5	0	1		3.1	77	180
8	35	08:00	450	1		3.2	65	170	18	6	08:00	192.5	0	1		3.1	77	180
8	36	08:00	450	1		3.2	65	170	18	6	20:00	192.5	0	1		3.1	77	180
8	37	08:00	450	1		3.2	65	170	18	7	07:55	0	0	0	1.65	3.5	79	180
8	38	08:00	450	1		3.2	65	170	18	7	08:00	197.5	0	1		3.5	79	180
8	39	08:00	450	1		3.2	65	170	18	7	20:00	197.5	0	1		3.5	79	180
8	40	08:00	450	1		3.2	65	170	18	8	08:00	197.5	0	1		3.5	79	180
8	41	08:00	450	1		3.2	65	170	18	8	20:00	197.5	0	1		3.5	79	180
8	42	07:55	0	0	0.37	3.1	66	170	18	9	08:00	197.5	0	1		3.5	79	180
8	42	08:00	450	1		3.1	66	170	18	9	20:00	197.5	0	1		3.5	79	180
8	43	08:00	450	1		3.1	66	170	18	10	07:55	0	0	0	1.19	3.4	78	180
8	44	08:00	450	1		3.1	66	170	18	10	08:00	195	0	1		3.4	78	180
8	45	08:00	450	1		3.1	66	170	18	10	20:00	195	0	1		3.4	78	180
8	46	08:00	450	1		3.1	66	170	18	11	08:00	195	0	1		3.4	78	180
8	47	08:00	450	1		3.1	66	170	18	11	20:00	195	0	1		3.4	78	180
8	48	08:00	450	1		3.1	66	170	18	12	08:00	195	0	1		3.4	78	180
8	49	07:55	0	0	0.38	3.1	66	170	18	12	20:00	195	0	1		3.4	78	180
8	49	08:00	450	1		3.1	66	170	18	13	08:00	195	0	1		3.4	78	180
#9	0	12:00	0	0	3.11	1.2	57	160	18	13	20:00	195	0	1		3.4	78	180
9	0	20:00	285	1		1.2	57	160	18	14	07:55	0	0	0	1.25	3.6	77	180
9	1	08:00	285	1		1.2	57	160	18	14	08:00	192.5	0	1		3.6	77	180
9	1	20:00	285	1		1.2	57	160	18	14	20:00	192.5	0	1		3.6	77	180
9	2	08:00	285	1		1.2	57	160	18	15	08:00	192.5	0	1		3.6	77	180
9	2	20:00	285	1		1.2	57	160	18	15	20:00	192.5	0	1		3.6	77	180

9	3	07:55	0	1	11.07	1.2	57	160	18	16	08:00	192.5	0	1		3.6	77	180
9	3	08:00	71.25	1		1.2	57	160	18	16	20:00	192.5	0	1		3.6	77	180
9	4	08:00	71.25	1		1.2	57	160	18	17	07:55	0	0	0	1.25	3.2	77	180
9	5	08:00	71.25	1		1.2	57	160	18	17	08:00	192.5	0	1		3.2	77	180
9	6	08:00	71.25	1		1.2	57	160	18	17	20:00	192.5	0	1		3.2	77	180
9	7	07:55	0	0	4.22	1.2	55	160	18	18	08:00	192.5	0	1		3.2	77	180
9	7	08:00	68.75	1		1.2	55	160	18	18	20:00	192.5	0	1		3.2	77	180
9	8	08:00	68.75	1		1.2	55	160	18	19	08:00	192.5	0	1		3.2	77	180
9	9	08:00	68.75	1		1.2	55	160	18	19	20:00	192.5	0	1		3.2	77	180
9	10	07:55	0	0	3.05	1.4	54	160	18	20	08:00	192.5	0	1		3.2	77	180
9	10	08:00	67.5	1		1.4	54	160	18	20	20:00	192.5	0	1		3.2	77	180
9	11	08:00	67.5	1		1.4	54	160	18	21	07:55	0	0	0	1.24	3.3	76	180
9	12	08:00	67.5	1		1.4	54	160	18	21	08:00	190	0	1		3.3	76	180
9	13	08:00	67.5	1		1.4	54	160	18	21	20:00	190	0	1		3.3	76	180
9	14	07:55	0	0	3.00	1.6	53	160	18	22	08:00	450	0	1		3.3	76	180
9	14	08:00	132.5	1		1.6	53	160	18	23	08:00	450	0	1		3.3	76	180
9	15	08:00	132.5	1		1.6	53	160	18	24	08:00	450	0	1		3.3	76	180
9	16	08:00	132.5	1		1.6	53	160	18	25	08:00	450	0	1		3.3	76	180
9	17	07:55	0	0	2.56	1.7	52	160	18	26	08:00	450	0	1		3.3	76	180
9	17	08:00	130	1		1.7	52	160	18	27	08:00	450	0	1		3.3	76	180
9	18	08:00	130	1		1.7	52	160	18	28	07:55	0	0	0	0.43	4.0	77	180
9	19	08:00	130	1		1.7	52	160	18	28	08:00	900	0	1		4.0	77	180
9	20	08:00	130	1		1.7	52	160	18	29	08:00	900	0	1		4.0	77	180
9	21	07:55	0	0	3.93	1.4	51	160	18	30	08:00	900	0	1		4.0	77	180
9	21	08:00	127.5	1		1.4	51	160	18	31	08:00	900	0	1		4.0	77	180
9	25	08:00	450	1		1.4	51	160	18	32	08:00	900	0	1		4.0	77	180
9	28	07:55	0	0	7.11	1.4	51	160	18	33	08:00	900	0	1		4.0	77	180
9	30	08:00	450	1		1.4	51	160	18	34	08:00	900	0	1		4.0	77	180
9	34	08:00	450	1		1.4	51	160	18	35	07:55	0	0	0	0.87	4.0	78	180
9	35	07:55	0	0	12.17	1.0	49	160	18	35	08:00	900	0	1		4.0	78	180
9	39	08:00	450	1		1.0	49	160	18	36	08:00	900	0	1		4.0	78	180
9	42	07:55	0	0	2.25	1.2	50	160	18	37	08:00	900	0	1		4.0	78	180
9	43	08:00	450	1		1.2	50	160	18	38	08:00	900	0	1		4.0	78	180
9	48	08:00	450	1		1.2	50	160	18	39	08:00	900	0	1		4.0	78	180
9	49	07:55	0	0	6.45	1.2	50	160	18	40	08:00	900	0	1		4.0	78	180
#10	0	12:00	0	0	0.18	3.7	56	168	18	41	08:00	900	0	1		4.0	78	180
10	0	20:00	140	1		3.7	56	168	18	42	07:55	0	0	0	1.02	4.1	79	180
10	1	08:00	140	1		3.7	56	168	18	42	08:00	450	0	1		4.1	79	180
10	1	20:00	140	1		3.7	56	168	18	43	08:00	450	0	1		4.1	79	180
10	2	08:00	140	1		3.7	56	168	18	44	08:00	450	0	1		4.1	79	180
10	2	20:00	140	1		3.7	56	168	18	45	08:00	450	0	1		4.1	79	180
10	3	07:55	0	0	0.44	4.2	55	168	18	46	08:00	450	0	1		4.1	79	180
10	3	08:00	137.5	1		4.2	55	168	18	47	08:00	450	0	1		4.1	79	180
10	3	20:00	137.5	1		4.2	55	168	18	48	08:00	450	0	1		4.1	79	180
10	4	08:00	137.5	1		4.2	55	168	18	49	08:00	450	0	1		4.1	79	180
10	4	20:00	137.5	1		4.2	55	168	#19	0	12:00	0	0	0	0.00	6.4	58	157
10	5	08:00	137.5	1		4.2	55	168	19	0	20:00	290	0	1		6.4	58	157
10	5	20:00	137.5	1		4.2	55	168	19	1	08:00	290	0	1		6.4	58	157
10	6	08:00	137.5	1		4.2	55	168	19	1	20:00	290	0	1		6.4	58	157
10	6	20:00	137.5	1		4.2	55	168	19	2	08:00	290	0	1		6.4	58	157
10	7	07:55	0	0	0.57	3.6	55	168	19	2	20:00	290	0	1		6.4	58	157
10	7	08:00	137.5	1		3.6	55	168	19	3	07:55	0	0	0	0.19	6.4	57	157
10	7	20:00	137.5	1		3.6	55	168	19	3	08:00	285	0	1		6.4	57	157
10	8	08:00	137.5	1		3.6	55	168	19	3	20:00	285	0	1		6.4	57	157
10	8	20:00	137.5	1		3.6	55	168	19	4	08:00	285	0	1		6.4	57	157
10	9	08:00	137.5	1		3.6	55	168	19	4	20:00	285	0	1		6.4	57	157
10	9	20:00	137.5	1		3.6	55	168	19	5	08:00	285	0	1		6.4	57	157
10	10	07:55	0	0	1.83	3.1	54	168	19	5	20:00	285	0	1		6.4	57	157
10	10	08:00	135	1		3.1	54	168	19	6	08:00	285	0	1		6.4	57	157

10	10	20:00	135	1		3.1	54	168	19	6	20:00	285	0	1		6.4	57	157
10	11	08:00	135	1		3.1	54	168	19	7	07:55	0	0	0	0.21	6.5	56	157
10	11	20:00	135	1		3.1	54	168	19	7	08:00	280	0	1		6.5	56	157
10	12	08:00	135	1		3.1	54	168	19	7	20:00	280	0	1		6.5	56	157
10	12	20:00	135	1		3.1	54	168	19	8	08:00	280	0	1		6.5	56	157
10	13	08:00	135	1		3.1	54	168	19	8	20:00	280	0	1		6.5	56	157
10	13	20:00	135	1		3.1	54	168	19	9	08:00	280	0	1		6.5	56	157
10	14	07:55	0	0	1.83	3.9	55	168	19	9	20:00	280	0	1		6.5	56	157
10	14	08:00	137.5	1		3.9	55	168	19	10	07:55	0	0	0	0.39	5.4	56	157
10	14	20:00	137.5	1		3.9	55	168	19	10	08:00	280	0	1		5.4	56	157
10	15	08:00	137.5	1		3.9	55	168	19	10	20:00	280	0	1		5.4	56	157
10	15	20:00	137.5	1		3.9	55	168	19	11	08:00	280	0	1		5.4	56	157
10	16	08:00	137.5	1		3.9	55	168	19	11	20:00	280	0	1		5.4	56	157
10	16	20:00	137.5	1		3.9	55	168	19	12	08:00	280	0	1		5.4	56	157
10	17	07:55	0	0	0.46	3.9	56	168	19	12	20:00	280	0	1		5.4	56	157
10	17	08:00	140	1		3.9	56	168	19	13	08:00	280	0	1		5.4	56	157
10	17	20:00	140	1		3.9	56	168	19	13	20:00	280	0	1		5.4	56	157
10	18	08:00	140	1		3.9	56	168	19	14	07:55	0	0	0	0.31	5.8	56	157
10	18	20:00	140	1		3.9	56	168	19	14	08:00	280	0	1		5.8	56	157
10	19	08:00	140	1		3.9	56	168	19	14	20:00	280	0	1		5.8	56	157
10	19	20:00	140	1		3.9	56	168	19	15	08:00	280	0	1		5.8	56	157
10	20	08:00	140	1		3.9	56	168	19	15	20:00	280	0	1		5.8	56	157
10	20	20:00	140	1		3.9	56	168	19	16	08:00	280	0	1		5.8	56	157
10	21	07:55	0	0	0.28	4.0	57	168	19	16	20:00	280	0	1		5.8	56	157
10	21	08:00	142.5	1		4.0	57	168	19	17	07:55	0	0	0	0.28	5.8	57	157
10	21	20:00	142.5	1		4.0	57	168	19	17	08:00	285	0	1		5.8	57	157
10	22	08:00	900	1		4.0	57	168	19	17	20:00	285	0	1		5.8	57	157
10	23	08:00	900	1		4.0	57	168	19	18	08:00	285	0	1		5.8	57	157
10	24	08:00	900	1		4.0	57	168	19	18	20:00	285	0	1		5.8	57	157
10	25	08:00	900	1		4.0	57	168	19	19	08:00	285	0	1		5.8	57	157
10	26	08:00	900	1		4.0	57	168	19	19	20:00	285	0	1		5.8	57	157
10	27	08:00	900	1		4.0	57	168	19	20	08:00	285	0	1		5.8	57	157
10	28	07:55	0	0	0.79	3.0	55	168	19	20	20:00	285	0	1		5.8	57	157
10	28	08:00	900	1		3.0	55	168	19	21	07:55	0	0	0	0.27	6.6	57	157
10	29	08:00	900	1		3.0	55	168	19	21	08:00	285	0	1		6.6	57	157
10	30	08:00	900	1		3.0	55	168	19	21	20:00	285	0	1		6.6	57	157
10	31	08:00	900	1		3.0	55	168	19	22	08:00	900	0	1		6.6	57	157
10	32	08:00	900	1		3.0	55	168	19	23	08:00	900	0	1		6.6	57	157
10	33	08:00	900	1		3.0	55	168	19	24	08:00	900	0	1		6.6	57	157
10	34	08:00	900	1		3.0	55	168	19	25	08:00	900	0	1		6.6	57	157
10	35	07:55	0	0	3.76	4.6	56	168	19	26	08:00	900	0	1		6.6	57	157
10	35	08:00	900	1		4.6	56	168	19	27	08:00	900	0	1		6.6	57	157
10	36	08:00	900	1		4.6	56	168	19	28	07:55	0	0	0	2.20	5.4	59	157
10	37	08:00	900	1		4.6	56	168	19	28	08:00	900	0	1		5.4	59	157
10	38	08:00	900	1		4.6	56	168	19	29	08:00	900	0	1		5.4	59	157
10	39	08:00	900	1		4.6	56	168	19	30	08:00	900	0	1		5.4	59	157
10	40	08:00	900	1		4.6	56	168	19	31	08:00	900	0	1		5.4	59	157
10	41	08:00	900	1		4.6	56	168	19	32	08:00	900	0	1		5.4	59	157
10	42	07:55	0	0	0.27	3.4	56	168	19	33	08:00	900	0	1		5.4	59	157
10	42	08:00	450	1		3.4	56	168	19	34	08:00	900	0	1		5.4	59	157
10	43	08:00	450	1		3.4	56	168	19	35	08:00	900	0	1		5.5	59	157
10	44	08:00	450	1		3.4	56	168	19	36	08:00	900	0	1		5.5	59	157
10	45	08:00	450	1		3.4	56	168	19	37	08:00	900	0	1		5.5	59	157
10	46	08:00	450	1		3.4	56	168	19	38	08:00	900	0	1		5.5	59	157
10	47	08:00	450	1		3.4	56	168	19	39	08:00	900	0	1		5.5	59	157
10	48	08:00	450	1		3.4	56	168	19	40	08:00	900	0	1		5.5	59	157
10	49	07:55	0	0	0.91	3.4	56	168	19	41	08:00	900	0	1		5.5	59	157
10	49	08:00	450	1		3.4	56	168	19	42	07:55	0	0	0	1.34	5.6	59	157
									19	42	08:00	900	0	1		5.6	59	157

19	43	08:00	900	0	1	5.6	59	157
19	44	08:00	900	0	1	5.6	59	157
19	45	08:00	900	0	1	5.6	59	157
19	46	08:00	900	0	1	5.6	59	157
19	47	08:00	900	0	1	5.6	59	157
19	48	08:00	900	0	1	5.6	59	157
19	49	08:00	900	0	1	5.6	59	157

8.3.2 PO-gruppen

#ID	DATE	TIME	AMT	MDV	CON	GFR	WT	HT	#ID	DATE	TIME	AMT	MDV	CON	GFR	WT	HT
#1	0	12:00	0	0	0.08	5.80	62	174	#10	0	12:00	0	0	1.01	2.17	39	165
1	0	20:00	450	1		5.80	62	174	10	0	08:00	450	1		2.17	39	165
1	1	08:00	450	1		5.80	62	174	10	1	08:00	450	1		2.17	39	165
1	1	20:00	450	1		5.80	62	174	10	2	08:00	450	1		2.17	39	165
1	2	08:00	450	1		5.80	62	174	10	3	07:55	0	0	2.89	2.17	39	165
1	2	20:00	450	1		5.80	62	174	10	3	08:00	450	1		2.17	39	165
1	3	07:55	0	0	6.61	5.05	62	174	10	3	20:00	450	1		3.19	42	165
1	3	08:00	450	1		5.05	60	174	10	4	08:00	450	1		3.19	42	165
1	3	20:00	450	1		5.05	60	174	10	4	20:00	450	1		3.19	42	165
1	4	08:00	450	1		5.05	60	174	10	5	08:00	450	1		3.19	42	165
1	4	20:00	450	1		5.05	60	174	10	5	20:00	450	1		3.19	42	165
1	5	08:00	450	1		5.05	60	174	10	6	08:00	450	1		3.19	42	165
1	5	20:00	450	1		5.05	60	174	10	6	20:00	450	1		3.19	42	165
1	6	08:00	450	1		5.05	60	174	10	7	07:55	0	0	2.95	2.86	41	165
1	6	20:00	450	1		5.05	60	174	10	7	08:00	450	1		2.86	41	165
1	7	07:55	0	0	10.32	4.51	59	174	10	7	20:00	450	1		2.86	41	165
1	7	08:00	450	1		4.51	59	174	10	8	08:00	450	1		2.86	41	165
1	7	20:00	450	1		4.51	59	174	10	8	20:00	450	1		2.86	41	165
1	8	08:00	450	1		4.51	59	174	10	9	08:00	450	1		2.86	41	165
1	8	20:00	450	1		4.51	59	174	10	9	20:00	450	1		2.86	41	165
1	9	08:00	450	1		4.51	59	174	10	10	08:00	450	1		3.19	42	165
1	9	20:00	450	1		4.51	59	174	10	10	20:00	450	1		3.19	42	165
1	10	07:55	0	0	3.26	4.51	59	174	10	11	08:00	450	1		3.19	42	165
1	10	08:00	450	1		4.51	59	174	10	11	20:00	450	1		3.19	42	165
1	10	20:00	450	1		4.51	59	174	10	12	08:00	450	1		3.19	42	165
1	11	08:00	450	1		4.51	59	174	10	12	20:00	450	1		3.19	42	165
1	11	20:00	450	1		4.51	59	174	10	13	08:00	450	1		3.19	42	165
1	12	08:00	450	1		4.51	59	174	10	13	20:00	450	1		3.19	42	165
1	12	20:00	450	1		4.51	59	174	10	14	08:00	450	1		3.27	43	165
1	13	08:00	450	1		4.51	59	174	10	14	20:00	450	1		3.27	43	165
1	13	20:00	450	1		4.51	59	174	10	15	08:00	450	1		3.27	43	165
1	14	07:55	0	0	2.27	5.52	59	174	10	15	20:00	450	1		3.27	43	165
1	14	08:00	450	1		5.52	59	174	10	16	08:00	450	1		3.27	43	165
1	14	20:00	450	1		5.52	59	174	10	16	20:00	450	1		3.27	43	165
1	15	08:00	450	1		5.52	59	174	10	17	08:00	450	1		3.12	41	165
1	15	20:00	450	1		5.52	59	174	10	17	20:00	450	1		3.12	41	165
1	16	08:00	450	1		5.52	59	174	10	18	08:00	450	1		3.12	41	165
1	16	20:00	450	1		5.52	59	174	10	18	20:00	450	1		3.12	41	165
1	17	07:55	0	0	2.47	4.97	59	174	10	19	08:00	450	1		3.12	41	165
1	17	08:00	450	1		4.97	59	174	10	19	20:00	450	1		3.12	41	165
1	17	20:00	450	1		4.97	59	174	10	20	08:00	450	1		3.12	41	165
1	18	08:00	450	1		4.97	59	174	10	20	20:00	450	1		3.12	41	165
1	18	20:00	450	1		4.97	59	174	10	21	08:00	450	1		3.12	41	165

1	19	08:00	450	1		4.97	59	174	10	21	20:00	450	1		3.12	41	165
1	19	20:00	450	1		4.97	59	174	10	22	08:00	450	1		3.12	41	165
1	20	08:00	450	1		4.97	59	174	10	23	08:00	450	1		3.12	41	165
1	20	20:00	450	1		4.97	59	174	10	24	08:00	450	1		3.12	41	165
1	21	07:55	0	0	1.99	5.30	63	174	10	25	08:00	450	1		3.12	41	165
1	21	08:00	450	1		5.30	63	174	10	26	08:00	450	1		3.12	41	165
1	21	20:00	450	1		5.30	63	174	10	27	08:00	450	1		3.12	41	165
1	22	08:00	900	1		5.30	63	174	10	28	08:00	450	1		3.19	42	165
1	23	08:00	900	1		5.30	63	174	10	29	08:00	450	1		3.19	42	165
1	24	08:00	900	1		5.30	63	174	10	30	08:00	450	1		3.19	42	165
1	25	08:00	900	1		5.30	63	174	10	31	08:00	450	1		3.19	42	165
1	26	08:00	900	1		5.30	63	174	10	32	08:00	450	1		3.19	42	165
1	27	08:00	900	1		5.30	63	174	10	33	08:00	450	1		3.19	42	165
1	28	07:55	0	0	0.35	5.39	64	174	10	34	08:00	450	1		3.19	42	165
1	28	08:00	900	1		5.39	64	174	10	35	08:00	450	1		3.50	42	165
1	29	08:00	900	1		5.39	64	174	10	36	08:00	450	1		3.50	42	165
1	30	08:00	900	1		5.39	64	174	10	37	08:00	450	1		3.50	42	165
1	31	08:00	900	1		5.39	64	174	10	38	08:00	450	1		3.50	42	165
1	32	08:00	900	1		5.39	64	174	10	39	08:00	450	1		3.50	42	165
1	33	08:00	900	1		5.39	64	174	10	40	08:00	450	1		3.50	42	165
1	34	08:00	900	1		5.39	64	174	10	41	08:00	450	1		3.50	42	165
1	35	07:55	0	0	0.47	4.97	65	174	10	42	08:00	450	1		3.27	43	165
1	35	08:00	900	1		4.97	65	174	10	43	08:00	450	1		3.27	43	165
1	36	08:00	900	1		4.97	65	174	10	44	08:00	450	1		3.27	43	165
1	37	08:00	900	1		4.97	65	174	10	45	08:00	450	1		3.27	43	165
1	38	08:00	900	1		4.97	65	174	10	46	08:00	450	1		3.27	43	165
1	39	08:00	900	1		4.97	65	174	10	47	08:00	450	1		3.27	43	165
1	40	08:00	900	1		4.97	65	174	10	48	08:00	450	1		3.27	43	165
1	41	08:00	900	1		4.97	65	174	10	49	08:00	450	1		3.27	43	165
1	42	07:55	0	0	0.31	5.47	65	174	#11	0	20:00	450	1		2.91	75	185
1	42	08:00	900	1		5.47	65	174	11	1	08:00	450	1		2.91	75	185
1	43	08:00	900	1		5.47	65	174	11	1	20:00	450	1		2.91	75	185
1	44	08:00	900	1		5.47	65	174	11	2	08:00	450	1		2.91	75	185
1	45	08:00	900	1		5.47	65	174	11	2	20:00	450	1		2.91	75	185
1	46	08:00	900	1		5.47	65	174	11	3	07:55	0	0	2.44	3.46	75	185
1	47	08:00	900	1		5.47	65	174	11	3	08:00	450	1		3.46	75	185
1	48	08:00	900	1		5.47	65	174	11	3	20:00	450	1		3.46	75	185
1	49	07:55	0	0	0.56	5.47	65	174	11	4	08:00	450	1		3.46	75	185
1	49	08:00	900	1		5.47	65	174	11	4	20:00	450	1		3.46	75	185
#2	0	12:00	0	0	0.91	3.08	57	160	11	5	08:00	450	1		3.46	75	185
2	0	20:00	450	1		3.08	57	160	11	5	20:00	450	1		3.46	75	185
2	1	08:00	450	1		3.08	57	160	11	6	08:00	450	1		3.46	75	185
2	1	20:00	450	1		3.08	57	160	11	6	20:00	450	1		3.46	75	185
2	2	08:00	450	1		3.08	57	160	11	7	07:55	0	0	3.65	3.29	75	185
2	2	20:00	450	1		3.08	57	160	11	7	08:00	450	1		3.29	75	185
2	3	07:55	0	0	4.61	3.97	60	160	11	7	20:00	450	1		3.29	75	185
2	3	08:00	450	1		3.97	60	160	11	8	08:00	450	1		3.29	75	185
2	3	20:00	450	1		3.97	60	160	11	8	20:00	450	1		3.29	75	185
2	4	08:00	450	1		3.97	60	160	11	9	08:00	450	1		3.29	75	185
2	4	20:00	450	1		3.97	60	160	11	9	20:00	450	1		3.29	75	185
2	5	08:00	450	1		3.97	60	160	11	10	07:55	0	0	2.88	3.47	74	185
2	5	20:00	450	1		3.97	60	160	11	10	08:00	450	1		3.47	74	185

2	6	08:00	450	1		3.97	60	160	11	10	20:00	450	1		3.47	74	185
2	6	20:00	450	1		3.97	60	160	11	11	08:00	450	1		3.47	74	185
2	7	07:55	0	0	9.25	4.31	58	160	11	11	20:00	450	1		3.47	74	185
2	7	08:00	450	1		4.31	58	160	11	12	08:00	450	1		3.47	74	185
2	7	20:00	450	1		4.31	58	160	11	12	20:00	450	1		3.47	74	185
2	8	08:00	450	1		4.31	58	160	11	13	08:00	450	1		3.47	74	185
2	8	20:00	450	1		4.31	58	160	11	13	20:00	450	1		3.47	74	185
2	9	08:00	450	1		4.31	58	160	11	14	07:55	0	0	3.26	3.41	75	185
2	9	20:00	450	1		4.31	58	160	11	14	08:00	450	1		3.41	75	185
2	10	07:55	0	0	13.19	4.39	59	160	11	14	20:00	450	1		3.41	75	185
2	10	08:00	450	1		4.39	59	160	11	15	08:00	450	1		3.41	75	185
2	10	20:00	450	1		4.39	59	160	11	15	20:00	450	1		3.41	75	185
2	11	08:00	450	1		4.39	59	160	11	16	08:00	450	1		3.41	75	185
2	11	20:00	450	1		4.39	59	160	11	16	20:00	450	1		3.41	75	185
2	12	08:00	450	1		4.39	59	160	11	17	07:55	0	0	3.67	3.29	75	185
2	12	20:00	450	1		4.39	59	160	11	17	08:00	450	1		3.29	75	185
2	13	08:00	450	1		4.39	59	160	11	17	20:00	450	1		3.29	75	185
2	13	20:00	450	1		4.39	59	160	11	18	08:00	450	1		3.29	75	185
2	14	07:55	0	0	6.23	4.61	62	160	11	18	20:00	450	1		3.29	75	185
2	14	08:00	450	1		4.61	62	160	11	19	08:00	450	1		3.29	75	185
2	14	20:00	450	1		4.61	62	160	11	19	20:00	450	1		3.29	75	185
2	15	08:00	450	1		4.61	62	160	11	20	08:00	450	1		3.29	75	185
2	15	20:00	450	1		4.61	62	160	11	20	20:00	450	1		3.29	75	185
2	16	08:00	450	1		4.61	62	160	11	21	07:55	0	0	3.71	3.60	75	185
2	16	20:00	450	1		4.61	62	160	11	21	08:00	450	1		3.60	75	185
2	17	07:55	0	0	6.17	4.03	61	160	11	21	20:00	450	1		3.60	75	185
2	17	08:00	450	1		4.03	61	160	11	22	08:00	450	1		3.60	75	185
2	17	20:00	450	1		4.03	61	160	11	23	08:00	450	1		3.60	75	185
2	18	08:00	450	1		4.03	61	160	11	24	08:00	450	1		3.60	75	185
2	18	20:00	450	1		4.03	61	160	11	25	08:00	450	1		3.60	75	185
2	19	08:00	450	1		4.03	61	160	11	26	08:00	450	1		3.60	75	185
2	19	20:00	450	1		4.03	61	160	11	27	08:00	450	1		3.60	75	185
2	20	08:00	450	1		4.03	61	160	11	28	08:00	450	1		3.60	75	185
2	20	20:00	450	1		4.03	61	160	11	29	08:00	450	1		3.60	75	185
2	21	07:55	0	0	7.56	3.97	60	160	11	30	08:00	450	1		3.60	75	185
2	21	08:00	450	1		3.97	60	160	11	31	08:00	450	1		3.60	75	185
2	21	20:00	450	1		3.97	60	160	11	32	08:00	450	1		3.60	75	185
2	22	08:00	900	1		3.97	60	160	11	33	08:00	450	1		3.60	75	185
2	23	08:00	900	1		3.97	60	160	11	34	08:00	450	1		3.60	75	185
2	24	08:00	900	1		3.97	60	160	11	35	07:55	0	0	0.49	3.96	74	185
2	25	08:00	900	1		3.97	60	160	11	35	08:00	900	1		3.96	74	185
2	26	08:00	900	1		3.97	60	160	11	36	08:00	900	1		3.96	74	185
2	27	08:00	900	1		3.97	60	160	11	37	08:00	900	1		3.96	74	185
2	28	08:00	0	0	1.29	3.63	61	160	11	38	08:00	900	1		3.96	74	185
2	28	08:00	900	1		3.63	61	160	11	39	08:00	900	1		3.96	74	185
2	29	08:00	900	1		3.63	61	160	11	40	08:00	900	1		3.96	74	185
2	30	08:00	900	1		3.63	61	160	11	41	08:00	900	1		3.96	74	185
2	31	08:00	900	1		3.63	61	160	11	42	07:55	0	0	1.99	4.45	75	185
2	32	08:00	900	1		3.63	61	160	11	42	08:00	900	1		4.45	75	185
2	33	08:00	900	1		3.63	61	160	11	43	08:00	900	1		4.45	75	185
2	34	08:00	900	1		3.63	61	160	11	44	08:00	900	1		4.45	75	185
2	35	07:55	0	0	1.19	2.97	60	160	11	45	08:00	900	1		4.45	75	185

2	35	08:00	900	1		2.97	60	160	11	46	08:00	900	1		4.45	75	185
2	36	08:00	900	1		2.97	60	160	11	47	08:00	900	1		4.45	75	185
2	37	08:00	900	1		2.97	60	160	11	48	08:00	900	1		4.45	75	185
2	38	08:00	900	1		2.97	60	160	11	49	07:55	0	0	2.44	4.45	75	185
2	39	08:00	900	1		2.97	60	160	11	49	08:00	900	1		4.45	75	185
2	40	08:00	900	1		2.97	60	160	#12	0	12:00	0	0	0.84	3.09	82	176
2	41	08:00	900	1		2.97	60	160	12	0	20:00	450	1		3.09	82	176
2	42	07:55	0	0	1.04	3.25	60	160	12	1	08:00	450	1		3.09	82	176
2	42	08:00	900	1		3.25	60	160	12	1	20:00	450	1		3.09	82	176
2	43	08:00	900	1		3.25	60	160	12	2	08:00	450	1		3.09	82	176
2	44	08:00	900	1		3.25	60	160	12	2	20:00	450	1		3.09	82	176
2	45	08:00	900	1		3.25	60	160	12	3	07:55	0	0	2.56	3.78	81	176
2	46	08:00	900	1		3.25	60	160	12	3	08:00	900	1		3.78	81	176
2	47	08:00	900	1		3.25	60	160	12	3	20:00	900	1		3.78	81	176
2	48	08:00	900	1		3.25	60	160	12	4	08:00	900	1		3.78	81	176
2	49	07:55	0	0	1.58	3.25	60	160	12	4	20:00	900	1		3.78	81	176
2	49	08:00	900	1		3.25	60	160	12	5	08:00	900	1		3.78	81	176
#3	0	12:00	0	0	1.38	4.32	53	167	12	5	20:00	900	1		3.78	81	176
3	0	20:00	900	1		4.32	53	167	12	6	08:00	900	1		3.78	81	176
3	1	08:00	900	1		4.32	53	167	12	6	20:00	900	1		3.78	81	176
3	1	20:00	900	1		4.32	53	167	12	7	07:55	0	0	4.57	3.63	82	176
3	2	08:00	900	1		4.32	53	167	12	7	08:00	900	1		3.63	82	176
3	2	20:00	900	1		4.32	53	167	12	7	20:00	900	1		3.63	82	176
3	3	07:55	0	0	2.26	3.83	53	167	12	8	08:00	900	1		3.63	82	176
3	3	08:00	900	1		3.83	53	167	12	8	20:00	900	1		3.63	82	176
3	3	20:00	900	1		3.83	53	167	12	9	08:00	900	1		3.63	82	176
3	4	08:00	900	1		3.83	53	167	12	9	20:00	900	1		3.63	82	176
3	4	20:00	900	1		3.83	53	167	12	10	07:55	0	0	5.08	3.72	84	176
3	5	08:00	900	1		3.83	53	167	12	10	08:00	900	1		3.72	84	176
3	5	20:00	900	1		3.83	53	167	12	10	20:00	900	1		3.72	84	176
3	6	08:00	900	1		3.83	53	167	12	11	08:00	900	1		3.72	84	176
3	6	20:00	900	1		3.83	53	167	12	11	20:00	900	1		3.72	84	176
3	7	07:55	0	0	1.84	4.42	55	167	12	12	08:00	900	1		3.72	84	176
3	7	08:00	900	1		4.42	55	167	12	12	20:00	900	1		3.72	84	176
3	7	20:00	900	1		4.42	55	167	12	13	08:00	900	1		3.72	84	176
3	8	08:00	900	1		4.42	55	167	12	13	20:00	900	1		3.72	84	176
3	8	20:00	900	1		4.42	55	167	12	14	07:55	0	0	5.87	3.41	84	176
3	9	08:00	900	1		4.42	55	167	12	14	08:00	450	1		3.41	84	176
3	9	20:00	900	1		4.42	55	167	12	14	20:00	450	1		3.41	84	176
3	10	07:55	900	1		3.90	54	167	12	15	08:00	450	1		3.41	84	176
3	10	20:00	900	1		3.90	54	167	12	15	20:00	450	1		3.41	84	176
3	11	08:00	900	1		3.90	54	167	12	16	08:00	450	1		3.41	84	176
3	11	20:00	900	1		3.90	54	167	12	16	20:00	450	1		3.41	84	176
3	12	08:00	900	1		3.90	54	167	12	17	07:55	0	0	2.51	3.51	84	176
3	12	20:00	900	1		3.90	54	167	12	17	08:00	450	1		3.51	84	176
3	13	08:00	900	1		3.90	54	167	12	17	20:00	450	1		3.51	84	176
3	13	20:00	900	1		3.90	54	167	12	18	08:00	450	1		3.51	84	176
3	14	07:55	0	0	4.27	4.42	55	167	12	18	20:00	450	1		3.51	84	176
3	14	08:00	900	1		4.42	55	167	12	19	08:00	450	1		3.51	84	176
3	14	20:00	900	1		4.42	55	167	12	19	20:00	450	1		3.51	84	176
3	15	08:00	900	1		4.42	55	167	12	20	08:00	450	1		3.51	84	176
3	15	20:00	900	1		4.42	55	167	12	20	20:00	450	1		3.51	84	176

3	16	08:00	900	1		4.42	55	167	12	21	07:55	0	0	3.29	3.74	84	176
3	16	20:00	900	1		4.42	55	167	12	21	08:00	450	1		3.74	84	176
3	17	08:00	900	1		3.90	54	167	12	21	20:00	450	1		3.74	84	176
3	17	20:00	900	1		3.90	54	167	12	22	08:00	900	1		3.74	84	176
3	18	08:00	900	1		3.90	54	167	12	23	08:00	900	1		3.74	84	176
3	18	20:00	900	1		3.90	54	167	12	24	08:00	900	1		3.74	84	176
3	19	08:00	900	1		3.90	54	167	12	25	08:00	900	1		3.74	84	176
3	19	20:00	900	1		3.90	54	167	12	26	08:00	900	1		3.74	84	176
3	20	08:00	900	1		3.90	54	167	12	27	08:00	900	1		3.74	84	176
3	20	20:00	900	1		3.90	54	167	12	28	07:55	0	0	1.33	3.17	84	176
3	21	07:55	0	0	6.32	3.90	54	167	12	28	08:00	450	1		3.17	84	176
3	21	08:00	900	1		3.90	54	167	12	29	08:00	450	1		3.17	84	176
3	21	20:00	900	1		3.90	54	167	12	30	08:00	450	1		3.17	84	176
3	22	08:00	900	1		3.90	54	167	12	31	08:00	450	1		3.17	84	176
3	23	08:00	900	1		3.90	54	167	12	32	08:00	450	1		3.17	84	176
3	24	08:00	900	1		3.90	54	167	12	33	08:00	450	1		3.17	84	176
3	25	08:00	900	1		3.90	54	167	12	34	08:00	450	1		3.17	84	176
3	26	08:00	900	1		3.90	54	167	12	35	07:55	0	0	0.69	3.29	84	176
3	27	08:00	900	1		3.90	54	167	12	35	08:00	450	1		3.29	84	176
3	28	08:00	900	1		4.50	56	167	12	36	08:00	450	1		3.29	84	176
3	29	08:00	900	1		4.50	56	167	12	37	08:00	450	1		3.29	84	176
3	30	08:00	900	1		4.50	56	167	12	38	08:00	450	1		3.29	84	176
3	31	08:00	900	1		4.50	56	167	12	39	08:00	450	1		3.29	84	176
3	32	08:00	900	1		4.50	56	167	12	40	08:00	450	1		3.29	84	176
3	33	08:00	900	1		4.50	56	167	12	41	08:00	450	1		3.29	84	176
3	34	08:00	900	1		4.50	56	167	12	42	08:00	450	1		2.95	84	176
3	35	07:55	0	0	4.35	4.50	56	167	12	43	08:00	450	1		2.95	84	176
3	35	08:00	900	1		4.50	56	167	12	44	08:00	450	1		2.95	84	176
3	36	08:00	900	1		4.50	56	167	12	45	08:00	450	1		2.95	84	176
3	37	08:00	900	1		4.50	56	167	12	46	08:00	450	1		2.95	84	176
3	38	08:00	900	1		4.50	56	167	12	47	08:00	450	1		2.95	84	176
3	39	08:00	900	1		4.50	56	167	12	48	08:00	450	1		2.95	84	176
3	40	08:00	900	1		4.50	56	167	12	49	08:00	450	1		2.95	84	176
3	41	08:00	900	1		4.50	56	167	#13	0	12:00	0	0	0.00	4.33	64	164
3	42	07:55	0	0	4.20	4.50	56	167	13	0	20:00	900	1		4.33	64	164
3	42	08:00	900	1		4.50	56	167	13	1	08:00	900	1		4.33	64	164
3	43	08:00	900	1		4.50	56	167	13	1	20:00	900	1		4.33	64	164
3	44	08:00	900	1		4.50	56	167	13	2	08:00	900	1		4.33	64	164
3	45	08:00	900	1		4.50	56	167	13	2	20:00	900	1		4.33	64	164
3	46	08:00	900	1		4.50	56	167	13	3	07:55	0	0	1.91	3.91	67	164
3	47	08:00	900	1		4.50	56	167	13	3	08:00	900	1		3.91	67	164
3	48	08:00	900	1		4.50	56	167	13	3	20:00	900	1		3.91	67	164
3	49	08:00	900	1		4.50	56	167	13	4	08:00	900	1		3.91	67	164
#4	0	12:00	0	0	1.07	3.64	63	154	13	4	20:00	900	1		3.91	67	164
4	0	20:00	900	1		3.64	63	154	13	5	08:00	900	1		3.91	67	164
4	1	08:00	900	1		3.64	63	154	13	5	20:00	900	1		3.91	67	164
4	1	20:00	900	1		3.64	63	154	13	6	08:00	900	1		3.91	67	164
4	2	08:00	900	1		3.64	63	154	13	6	20:00	900	1		3.91	67	164
4	2	20:00	900	1		3.64	63	154	13	7	07:55	0	0	1.54	6.22	69	164
4	3	07:55	0	0	3.88	3.64	63	154	13	7	08:00	900	1		6.22	69	164
4	3	08:00	900	1		3.64	63	154	13	7	20:00	900	1		6.22	69	164
4	3	20:00	900	1		3.64	63	154	13	8	08:00	900	1		6.22	69	164

4	4	08:00	900	1		3.64	63	154	13	8	20:00	900	1		6.22	69	164
4	4	20:00	900	1		3.64	63	154	13	9	08:00	900	1		6.22	69	164
4	5	08:00	900	1		3.64	63	154	13	9	20:00	900	1		6.22	69	164
4	5	20:00	900	1		3.64	63	154	13	10	07:55	0	0	6.85	4.89	69	164
4	6	08:00	900	1		3.64	63	154	13	10	08:00	900	1		4.89	69	164
4	6	20:00	900	1		3.64	63	154	13	10	20:00	900	1		4.89	69	164
4	7	07:55	0	0	4.08	3.64	63	154	13	11	08:00	900	1		4.89	69	164
4	7	08:00	900	1		3.64	63	154	13	11	20:00	900	1		4.89	69	164
4	7	20:00	900	1		3.64	63	154	13	12	08:00	900	1		4.89	69	164
4	8	08:00	900	1		3.64	63	154	13	12	20:00	900	1		4.89	69	164
4	8	20:00	900	1		3.64	63	154	13	13	08:00	900	1		4.89	69	164
4	9	08:00	900	1		3.64	63	154	13	13	20:00	900	1		4.89	69	164
4	9	20:00	900	1		3.64	63	154	13	14	07:55	0	0	2.82	5.30	70	164
4	10	07:55	0	0	4.64	3.64	63	154	13	14	08:00	900	1		5.30	70	164
4	10	08:00	900	1		3.64	63	154	13	14	20:00	900	1		5.30	70	164
4	10	20:00	900	1		3.64	63	154	13	15	08:00	900	1		5.30	70	164
4	11	08:00	900	1		3.64	63	154	13	15	20:00	900	1		5.30	70	164
4	11	20:00	900	1		3.64	63	154	13	16	08:00	900	1		5.30	70	164
4	12	08:00	900	1		3.64	63	154	13	16	20:00	900	1		5.30	70	164
4	12	20:00	900	1		3.64	63	154	13	17	07:55	0	0	1.36	4.96	70	164
4	13	08:00	900	1		3.64	63	154	13	17	08:00	900	1		4.96	70	164
4	13	20:00	900	1		3.64	63	154	13	17	20:00	900	1		4.96	70	164
4	14	07:55	0	0	5.72	3.41	59	154	13	18	08:00	900	1		4.96	70	164
4	14	08:00	450	1		3.41	59	154	13	18	20:00	900	1		4.96	70	164
4	14	20:00	450	1		3.41	59	154	13	19	08:00	900	1		4.96	70	164
4	15	08:00	450	1		3.41	59	154	13	19	20:00	900	1		4.96	70	164
4	15	20:00	450	1		3.41	59	154	13	20	08:00	900	1		4.96	70	164
4	16	08:00	450	1		3.41	59	154	13	20	20:00	900	1		4.96	70	164
4	16	20:00	450	1		3.41	59	154	13	21	07:55	0	0	1.68	4.66	71	164
4	17	07:55	0	0	1.69	3.41	59	154	13	21	08:00	900	1		4.66	71	164
4	17	08:00	450	1		3.75	60	154	13	21	20:00	900	1		4.66	71	164
4	17	20:00	450	1		3.75	60	154	13	22	08:00	900	1		4.66	71	164
4	18	08:00	450	1		3.75	60	154	13	23	08:00	900	1		4.66	71	164
4	18	20:00	450	1		3.75	60	154	13	24	08:00	900	1		4.66	71	164
4	19	08:00	450	1		3.75	60	154	13	25	08:00	900	1		4.66	71	164
4	19	20:00	450	1		3.75	60	154	13	26	08:00	900	1		4.66	71	164
4	20	08:00	450	1		3.75	60	154	13	27	08:00	900	1		4.66	71	164
4	20	20:00	450	1		3.75	60	154	13	28	07:55	0	0	0.19	5.83	71	164
4	21	07:55	0	0	3.05	4.16	61	154	13	28	08:00	900	1		5.83	71	164
4	21	08:00	450	1		4.16	61	154	13	29	08:00	900	1		5.83	71	164
4	21	20:00	450	1		4.16	61	154	13	30	08:00	900	1		5.83	71	164
4	22	08:00	900	1		4.16	61	154	13	31	08:00	900	1		5.83	71	164
4	23	08:00	900	1		4.16	61	154	13	32	08:00	900	1		5.83	71	164
4	24	08:00	900	1		4.16	61	154	13	33	08:00	900	1		5.83	71	164
4	25	08:00	900	1		4.16	61	154	13	34	08:00	900	1		5.83	71	164
4	26	08:00	900	1		4.16	61	154	13	35	08:00	900	1		5.99	73	164
4	27	08:00	900	1		4.16	61	154	13	36	08:00	900	1		5.99	73	164
4	28	07:55	0	0	0.76	4.16	61	154	13	37	08:00	900	1		5.99	73	164
4	28	08:00	900	1		3.82	61	154	13	38	08:00	900	1		5.99	73	164
4	29	08:00	900	1		3.82	61	154	13	39	08:00	900	1		5.99	73	164
4	30	08:00	900	1		3.82	61	154	13	40	08:00	900	1		5.99	73	164
4	31	08:00	900	1		3.82	61	154	13	41	08:00	900	1		5.99	73	164

4	32	08:00	900	1		3.82	61	154	13	42	07:55	0	0	0.29	6.05	73	164
4	33	08:00	900	1		3.82	61	154	13	42	08:00	900	1		6.05	73	164
4	34	08:00	900	1		3.82	61	154	13	43	08:00	900	1		6.05	73	164
4	35	07:55	0	0	0.90	3.75	60	154	13	44	08:00	900	1		6.05	73	164
4	35	08:00	900	1		3.75	60	154	13	45	08:00	900	1		6.05	73	164
4	36	08:00	900	1		3.75	60	154	13	46	08:00	900	1		6.05	73	164
4	37	08:00	900	1		3.75	60	154	13	47	08:00	900	1		6.05	73	164
4	38	08:00	900	1		3.75	60	154	13	48	08:00	900	1		6.05	73	164
4	39	08:00	900	1		3.75	60	154	13	49	07:55	0	0	0.32	6.05	73	164
4	40	08:00	900	1		3.75	60	154	13	49	08:00	900	1		6.05	73	164
4	41	08:00	900	1		3.75	60	154	#14	0	12:00	0	0	0.00	3.75	85	180
4	42	07:55	0	0	10.90	3.41	59	154	14	0	20:00	450	1		3.75	85	180
4	42	08:00	900	1		3.41	59	154	14	1	08:00	450	1		3.75	85	180
4	43	08:00	900	1		3.41	59	154	14	1	20:00	450	1		3.75	85	180
4	44	08:00	900	1		3.41	59	154	14	2	08:00	450	1		3.75	85	180
4	45	08:00	900	1		3.41	59	154	14	2	20:00	450	1		3.75	85	180
4	46	08:00	900	1		3.41	59	154	14	3	07:55	0	0	2.18	3.57	82	180
4	47	08:00	900	1		3.41	59	154	14	3	08:00	450	1		3.57	82	180
4	48	08:00	900	1		3.41	59	154	14	3	20:00	450	1		3.57	82	180
4	49	07:55	0	0	0.76	3.41	59	154	14	4	08:00	450	1		3.57	82	180
4	49	08:00	900	1		3.41	59	154	14	4	20:00	450	1		3.57	82	180
#5	0	12:00	0	0	0.00	2.34	58	158	14	5	08:00	450	1		3.57	82	180
5	0	20:00	450	1		2.34	58	158	14	5	20:00	450	1		3.57	82	180
5	1	08:00	450	1		2.34	58	158	14	6	08:00	450	1		3.57	82	180
5	1	20:00	450	1		2.34	58	158	14	6	20:00	450	1		3.57	82	180
5	2	08:00	450	1		2.34	58	158	14	7	07:55	0	0	2.31	3.28	80	180
5	2	20:00	450	1		2.34	58	158	14	7	08:00	450	1		3.28	80	180
5	3	07:55	0	0	3.57	2.21	58	158	14	7	20:00	450	1		3.28	80	180
5	3	08:00	450	1		2.21	58	158	14	8	08:00	450	1		3.28	80	180
5	3	20:00	450	1		2.21	58	158	14	8	20:00	450	1		3.28	80	180
5	4	08:00	450	1		2.21	58	158	14	9	08:00	450	1		3.28	80	180
5	4	20:00	450	1		2.21	58	158	14	9	20:00	450	1		3.28	80	180
5	5	08:00	450	1		2.21	58	158	14	10	07:55	0	0	2.77	3.01	79	180
5	5	20:00	450	1		2.21	58	158	14	10	08:00	450	1		3.01	79	180
5	6	08:00	450	1		2.21	58	158	14	10	20:00	450	1		3.01	79	180
5	6	20:00	450	1		2.21	58	158	14	11	08:00	450	1		3.01	79	180
5	7	07:55	0	0	0.94	2.21	58	158	14	11	20:00	450	1		3.01	79	180
5	7	08:00	450	1		2.34	58	158	14	12	08:00	450	1		3.01	79	180
5	8	20:00	450	1		2.34	58	158	14	12	20:00	450	1		3.01	79	180
5	9	08:00	450	1		2.34	58	158	14	13	08:00	450	1		3.01	79	180
5	10	07:55	0	0	0.82	2.49	58	158	14	13	20:00	450	1		3.01	79	180
5	10	08:00	450	1		2.49	58	158	14	14	07:55	0	0	2.84	3.16	78	180
5	11	08:00	450	1		2.49	58	158	14	14	08:00	450	1		3.16	78	180
5	12	08:00	450	1		2.49	58	158	14	14	20:00	450	1		3.16	78	180
5	13	08:00	450	1		2.49	58	158	14	15	08:00	450	1		3.16	78	180
5	14	07:55	0	0	0.66	2.53	59	158	14	15	20:00	450	1		3.16	78	180
5	14	08:00	450	1		2.53	59	158	14	16	08:00	450	1		3.16	78	180
5	15	08:00	450	1		2.53	59	158	14	16	20:00	450	1		3.16	78	180
5	16	08:00	450	1		2.53	59	158	14	17	07:55	0	0	1.67	2.97	78	180
5	17	07:55	0	0	0.60	2.49	58	158	14	17	08:00	450	1		2.97	78	180
5	17	08:00	450	1		2.49	58	158	14	17	20:00	450	1		2.97	78	180
5	18	08:00	450	1		2.49	58	158	14	18	08:00	450	1		2.97	78	180

5	19	08:00	450	1		2.49	58	158	14	18	20:00	450	1		2.97	78	180
5	20	08:00	450	1		2.49	58	158	14	19	08:00	450	1		2.97	78	180
5	21	07:55	0	0	0.63	2.49	58	158	14	19	20:00	450	1		2.97	78	180
5	21	08:00	450	1		2.70	59	158	14	20	08:00	450	1		2.97	78	180
5	22	08:00	450	1		2.70	59	158	14	20	20:00	450	1		2.97	78	180
5	23	08:00	450	1		2.70	59	158	14	21	07:55	0	0	4.90	2.95	79	180
5	24	08:00	450	1		2.70	59	158	14	21	08:00	450	1		2.95	79	180
5	25	08:00	450	1		2.70	59	158	14	21	20:00	450	1		2.95	79	180
5	26	08:00	450	1		2.70	59	158	14	22	08:00	450	1		2.95	79	180
5	27	08:00	450	1		2.70	59	158	14	23	08:00	450	1		2.95	79	180
5	28	07:55	0	0	0.69	2.53	59	158	14	24	08:00	450	1		2.95	79	180
5	28	08:00	450	1		2.53	59	158	14	25	08:00	450	1		2.95	79	180
5	29	08:00	450	1		2.53	59	158	14	26	08:00	450	1		2.95	79	180
5	30	08:00	450	1		2.53	59	158	14	27	08:00	450	1		2.95	79	180
5	31	08:00	450	1		2.53	59	158	14	28	07:55	0	0	0.92	3.31	79	180
5	32	08:00	450	1		2.53	59	158	14	28	08:00	450	1		3.31	79	180
5	33	08:00	450	1		2.53	59	158	14	29	08:00	450	1		3.31	79	180
5	34	08:00	450	1		2.53	59	158	14	30	08:00	450	1		3.31	79	180
5	35	08:00	450	1		2.75	60	158	14	31	08:00	450	1		3.31	79	180
5	36	08:00	450	1		2.75	60	158	14	32	08:00	450	1		3.31	79	180
5	37	08:00	450	1		2.75	60	158	14	33	08:00	450	1		3.31	79	180
5	38	08:00	450	1		2.75	60	158	14	34	08:00	450	1		3.31	79	180
5	39	08:00	450	1		2.75	60	158	14	35	07:55	0	0	0.92	3.35	81	180
5	40	08:00	450	1		2.75	60	158	14	35	08:00	450	1		3.35	81	180
5	41	08:00	450	1		2.75	60	158	14	36	08:00	450	1		3.35	81	180
5	42	08:00	450	1		2.58	60	158	14	37	08:00	450	1		3.35	81	180
5	43	08:00	450	1		2.58	60	158	14	38	08:00	450	1		3.35	81	180
5	44	08:00	450	1		2.58	60	158	14	39	08:00	450	1		3.35	81	180
5	45	08:00	450	1		2.58	60	158	14	40	08:00	450	1		3.35	81	180
5	46	08:00	450	1		2.58	60	158	14	41	08:00	450	1		3.35	81	180
5	47	08:00	450	1		2.58	60	158	14	42	07:55	0	0	0.71	3.49	82	180
5	48	08:00	450	1		2.58	60	158	14	42	08:00	450	1		3.49	82	180
5	49	08:00	450	1		2.58	60	158	14	43	08:00	450	1		3.49	82	180
#6	0	12:00	0	0	0.06	1.61	62	160	14	44	08:00	450	1		3.49	82	180
6	0	08:00	450	1		1.61	62	160	14	45	08:00	450	1		3.49	82	180
6	1	08:00	450	1		1.61	62	160	14	46	08:00	450	1		3.49	82	180
6	2	08:00	450	1		1.61	62	160	14	47	08:00	450	1		3.49	82	180
6	3	07:55	0	0	2.33	1.40	60	160	14	48	08:00	450	1		3.49	82	180
6	3	08:00	450	1		1.40	60	160	14	49	07:55	0	0	0.00	3.49	82	180
6	5	08:00	450	1		1.40	60	160	14	49	08:00	450	1		3.49	82	180
6	7	07:55	0	0	0.64	1.48	61	160	#15	0	12:00	0	0	0.00	2.30	72	172
6	7	08:00	450	1		1.48	61	160	15	0	08:00	450	1		2.30	72	172
6	9	08:00	450	1		1.48	61	160	15	1	08:00	450	1		2.30	72	172
6	10	07:55	0	1	3.16	1.19	59	160	15	2	08:00	450	1		2.30	72	172
6	11	08:00	450	1		1.19	59	160	15	3	07:55	0	0	1.80	2.22	71	172
6	13	08:00	450	1		1.19	59	160	15	3	08:00	450	1		2.22	71	172
6	14	07:55	0	0	3.74	1.14	58	160	15	4	08:00	450	1		2.22	71	172
6	15	08:00	450	1		1.14	58	160	15	5	08:00	450	1		2.22	71	172
6	17	07:55	0	0	0.86	1.28	58	160	15	6	08:00	450	1		2.22	71	172
6	17	08:00	450	1		1.28	58	160	15	7	07:55	0	0	1.68	2.12	71	172
6	19	08:00	450	1		1.28	58	160	15	7	08:00	450	1		2.12	71	172
6	21	07:55	0	0	0.60	1.54	58	160	15	8	08:00	450	1		2.12	71	172

6	21	08:00	450	1		1.54	58	160	15	9	08:00	450	1		2.12	71	172
6	23	08:00	450	1		1.54	58	160	15	10	07:55	0	0	1.52	2.18	70	172
6	25	08:00	450	1		1.54	58	160	15	10	08:00	450	1		2.18	70	172
6	27	08:00	450	1		1.54	58	160	15	11	08:00	450	1		2.18	70	172
6	28	07:55	0	0	1.99	1.74	58	160	15	12	08:00	450	1		2.18	70	172
6	29	08:00	450	1		1.74	58	160	15	13	08:00	450	1		2.18	70	172
6	31	08:00	450	1		1.74	58	160	15	14	07:55	0	0	1.68	2.47	70	172
6	33	08:00	450	1		1.74	58	160	15	14	08:00	450	1		2.47	70	172
6	35	07:55	0	0	0.40	1.60	58	160	15	15	08:00	450	1		2.47	70	172
6	35	08:00	450	1		1.60	58	160	15	16	08:00	450	1		2.47	70	172
6	37	08:00	450	1		1.60	58	160	15	17	07:55	0	0	1.26	2.53	71	172
6	39	08:00	450	1		1.60	58	160	15	17	08:00	450	1		2.53	71	172
6	41	08:00	450	1		1.60	58	160	15	17	08:00	450	1		2.53	71	172
6	42	07:55	0	0	0.45	1.53	59	160	15	18	08:00	450	1		2.53	71	172
6	43	08:00	450	1		1.53	59	160	15	18	08:00	450	1		2.53	71	172
6	45	08:00	450	1		1.53	59	160	15	19	08:00	450	1		2.53	71	172
6	47	08:00	450	1		1.53	59	160	15	19	08:00	450	1		2.53	71	172
6	49	07:55	0	0	3.19	1.53	59	160	15	20	08:00	450	1		2.53	71	172
6	49	08:00	450	1		1.53	59	160	15	20	08:00	450	1		2.53	71	172
#7	0	12:00	0	0	0.06	2.92	76	170	15	21	07:55	0	0	2.07	2.82	72	172
7	0	20:00	450	1		2.92	76	170	15	21	08:00	450	1		2.82	72	172
7	1	08:00	450	1		2.92	76	170	15	21	08:00	450	1		2.82	72	172
7	1	20:00	450	1		2.92	76	170	15	22	08:00	450	1		2.82	72	172
7	2	08:00	450	1		2.92	76	170	15	23	08:00	450	1		2.82	72	172
7	2	20:00	450	1		2.92	76	170	15	24	08:00	450	1		2.82	72	172
7	3	07:55	0	0	1.53	2.92	76	170	15	25	08:00	450	1		2.82	72	172
7	3	08:00	450	1		2.81	77	170	15	26	08:00	450	1		2.82	72	172
7	3	20:00	450	1		2.81	77	170	15	27	08:00	450	1		2.82	72	172
7	4	08:00	450	1		2.81	77	170	15	28	07:55	0	0	1.05	2.93	71	172
7	4	20:00	450	1		2.81	77	170	15	28	08:00	450	1		2.93	71	172
7	5	08:00	450	1		2.81	77	170	15	29	08:00	450	1		2.93	71	172
7	5	20:00	450	1		2.81	77	170	15	30	08:00	450	1		2.93	71	172
7	6	08:00	450	1		2.81	77	170	15	31	08:00	450	1		2.93	71	172
7	6	20:00	450	1		2.81	77	170	15	32	08:00	450	1		2.93	71	172
7	7	08:00	450	1		2.81	77	170	15	33	08:00	450	1		2.93	71	172
7	7	20:00	450	1		2.81	77	170	15	34	08:00	450	1		2.93	71	172
7	8	08:00	450	1		2.81	77	170	15	35	07:55	0	0	6.14	3.22	75	172
7	8	20:00	450	1		2.81	77	170	15	35	08:00	450	1		3.22	75	172
7	9	08:00	450	1		2.81	77	170	15	36	08:00	450	1		3.22	75	172
7	9	20:00	450	1		2.81	77	170	15	37	08:00	450	1		3.22	75	172
7	10	07:55	0	0	4.45	2.86	79	170	15	38	08:00	450	1		3.22	75	172
7	10	08:00	450	1		2.86	79	170	15	39	08:00	450	1		3.22	75	172
7	10	20:00	450	1		2.86	79	170	15	40	08:00	450	1		3.22	75	172
7	11	08:00	450	1		2.86	79	170	15	41	08:00	450	1		3.22	75	172
7	11	20:00	450	1		2.86	79	170	15	42	07:55	0	0	0.80	3.12	75	172
7	12	08:00	450	1		2.86	79	170	15	42	08:00	450	1		3.12	75	172
7	12	20:00	450	1		2.86	79	170	15	43	08:00	450	1		3.12	75	172
7	13	08:00	450	1		2.86	79	170	15	44	08:00	450	1		3.12	75	172
7	13	20:00	450	1		2.86	79	170	15	45	08:00	450	1		3.12	75	172
7	14	07:55	0	0	2.33	2.86	80	170	15	46	08:00	450	1		3.12	75	172
7	14	08:00	450	1		2.86	80	170	15	47	08:00	450	1		3.12	75	172
7	14	20:00	450	1		2.86	80	170	15	48	08:00	450	1		3.12	75	172

7	15	08:00	450	1		2.86	80	170	15	49	07:55	0	0	0.71	3.12	75	172
7	15	20:00	450	1		2.86	80	170	15	49	08:00	450	1		3.12	75	172
7	16	08:00	450	1		2.86	80	170	#16	0	12:00	0	0	0.00	5.77	80	169
7	16	20:00	450	1		2.86	80	170	16	0	20:00	900	1		5.77	80	169
7	17	07:55	0	0	3.11	2.63	79	170	16	1	08:00	900	1		5.77	80	169
7	17	08:00	450	1		2.63	79	170	16	1	20:00	900	1		5.77	80	169
7	17	20:00	450	1		2.63	79	170	16	2	08:00	900	1		5.77	80	169
7	18	08:00	450	1		2.63	79	170	16	2	20:00	900	1		5.77	80	169
7	18	20:00	450	1		2.63	79	170	16	3	08:00	900	1		6.51	80	169
7	19	08:00	450	1		2.63	79	170	16	3	20:00	900	1		6.51	80	169
7	19	20:00	450	1		2.63	79	170	16	4	08:00	900	1		6.51	80	169
7	20	08:00	450	1		2.63	79	170	16	4	20:00	900	1		6.51	80	169
7	20	20:00	450	1		2.63	79	170	16	5	08:00	900	1		6.51	80	169
7	21	07:55	0	0	2.73	3.03	81	170	16	5	20:00	900	1		6.51	80	169
7	21	08:00	450	1		3.03	81	170	16	6	08:00	900	1		6.51	80	169
7	21	20:00	450	1		3.03	81	170	16	6	20:00	900	1		6.51	80	169
7	22	08:00	450	1		3.03	81	170	16	7	07:55	0	0	1.81	6.51	80	169
7	23	08:00	450	1		3.03	81	170	16	7	08:00	900	1		6.51	80	169
7	24	08:00	450	1		3.03	81	170	16	7	20:00	900	1		6.51	80	169
7	25	08:00	450	1		3.03	81	170	16	8	08:00	900	1		6.51	80	169
7	26	08:00	450	1		3.03	81	170	16	8	20:00	900	1		6.51	80	169
7	27	08:00	450	1		3.03	81	170	16	9	08:00	900	1		6.51	80	169
7	28	07:55	0	0	0.23	3.02	83	170	16	9	20:00	900	1		6.51	80	169
7	28	08:00	450	1		3.02	83	170	16	10	07:55	0	0	1.05	6.22	80	169
7	29	08:00	450	1		3.02	83	170	16	10	08:00	900	1		6.22	80	169
7	30	08:00	450	1		3.02	83	170	16	10	20:00	900	1		6.22	80	169
7	31	08:00	450	1		3.02	83	170	16	11	08:00	900	1		6.22	80	169
7	32	08:00	450	1		3.02	83	170	16	11	20:00	900	1		6.22	80	169
7	33	08:00	450	1		3.02	83	170	16	12	08:00	900	1		6.22	80	169
7	34	08:00	450	1		3.02	83	170	16	12	20:00	900	1		6.22	80	169
7	35	08:00	450	1		2.84	81	170	16	13	08:00	900	1		6.22	80	169
7	36	08:00	450	1		2.84	81	170	16	13	20:00	900	1		6.22	80	169
7	37	08:00	450	1		2.84	81	170	16	14	07:55	0	0	2.30	6.09	80	169
7	38	08:00	450	1		2.84	81	170	16	14	08:00	900	1		6.09	80	169
7	39	08:00	450	1		2.84	81	170	16	14	20:00	900	1		6.09	80	169
7	40	08:00	450	1		2.84	81	170	16	15	08:00	900	1		6.09	80	169
7	41	08:00	450	1		2.84	81	170	16	15	20:00	900	1		6.09	80	169
7	42	08:00	450	1		3.26	78	170	16	16	08:00	900	1		6.09	80	169
7	43	08:00	450	1		3.26	78	170	16	16	20:00	900	1		6.09	80	169
7	44	08:00	450	1		3.26	78	170	16	17	07:55	0	0	2.43	5.85	81	169
7	45	08:00	450	1		3.26	78	170	16	17	08:00	900	1		5.85	81	169
7	46	08:00	450	1		3.26	78	170	16	17	20:00	900	1		5.85	81	169
7	47	08:00	450	1		3.26	78	170	16	18	08:00	900	1		5.85	81	169
7	48	08:00	450	1		3.26	78	170	16	18	20:00	900	1		5.85	81	169
7	49	08:00	450	1		3.26	78	170	16	19	08:00	900	1		5.85	81	169
#8	0	12:00	0	0	0.00	5.71	57	166	16	19	20:00	900	1		5.85	81	169
8	0	20:00	900	1		5.71	57	166	16	20	08:00	900	1		5.85	81	169
8	1	08:00	900	1		5.71	57	166	16	20	20:00	900	1		5.85	81	169
8	1	20:00	900	1		5.71	57	166	16	21	07:55	0	0	2.14	5.96	80	169
8	2	08:00	900	1		5.71	57	166	16	21	08:00	900	1		5.96	80	169
8	2	20:00	900	1		5.71	57	166	16	21	20:00	900	1		5.96	80	169
8	3	07:55	0	0	3.31	5.52	63	166	16	22	08:00	900	1		5.96	80	169

8	3	08:00	900	1		5.52	63	166	16	23	08:00	900	1		5.96	80	169
8	3	20:00	900	1		5.52	63	166	16	24	08:00	900	1		5.96	80	169
8	4	08:00	900	1		5.52	63	166	16	25	08:00	900	1		5.96	80	169
8	4	20:00	900	1		5.52	63	166	16	26	08:00	900	1		5.96	80	169
8	5	08:00	900	1		5.52	63	166	16	27	08:00	900	1		5.96	80	169
8	5	20:00	900	1		5.52	63	166	16	28	07:55	0	0	0.27	5.73	81	169
8	6	08:00	900	1		5.52	63	166	16	28	08:00	900	1		5.73	81	169
8	6	20:00	900	1		5.52	63	166	16	29	08:00	900	1		5.73	81	169
8	7	07:55	0	0	1.90	5.91	59	166	16	30	08:00	900	1		5.73	81	169
8	7	08:00	900	1		5.91	59	166	16	31	08:00	900	1		5.73	81	169
8	7	20:00	900	1		5.91	59	166	16	32	08:00	900	1		5.73	81	169
8	8	08:00	900	1		5.91	59	166	16	33	08:00	900	1		5.73	81	169
8	8	20:00	900	1		5.91	59	166	16	34	08:00	900	1		5.73	81	169
8	9	08:00	900	1		5.91	59	166	16	35	07:55	0	0	0.59	4.78	82	169
8	9	20:00	900	1		5.91	59	166	16	35	08:00	900	1		4.78	82	169
8	10	07:55	0	0	2.08	4.73	54	166	16	36	08:00	900	1		4.78	82	169
8	10	08:00	900	1		4.73	54	166	16	37	08:00	900	1		4.78	82	169
8	10	20:00	900	1		4.73	54	166	16	38	08:00	900	1		4.78	82	169
8	11	08:00	900	1		4.73	54	166	16	39	08:00	900	1		4.78	82	169
8	11	20:00	900	1		4.73	54	166	16	40	08:00	900	1		4.78	82	169
8	12	08:00	900	1		4.73	54	166	16	41	08:00	900	1		4.78	82	169
8	12	20:00	900	1		4.73	54	166	16	42	07:55	0	0	0.31	5.36	82	169
8	13	08:00	900	1		4.73	54	166	16	42	08:00	900	1		5.36	82	169
8	13	20:00	900	1		4.73	54	166	16	43	08:00	900	1		5.36	82	169
8	14	07:55	0	0	3.03	5.41	54	166	16	44	08:00	900	1		5.36	82	169
8	14	08:00	900	1		5.41	54	166	16	45	08:00	900	1		5.36	82	169
8	14	20:00	900	1		5.41	54	166	16	46	08:00	900	1		5.36	82	169
8	15	08:00	900	1		5.41	54	166	16	47	08:00	900	1		5.36	82	169
8	15	20:00	900	1		5.41	54	166	16	48	08:00	900	1		5.36	82	169
8	16	08:00	900	1		5.41	54	166	16	49	07:55	0	0	0.00	5.36	82	169
8	16	20:00	900	1		5.41	54	166	16	49	08:00	900	1		5.36	82	169
8	17	07:55	0	0	1.98	6.31	54	166	#17	0	12:00	0	0	0.00	3.74	63	
8	17	08:00	900	1		6.31	54	166	17	0	20:00	900	1		3.74	63	
8	17	20:00	900	1		6.31	54	166	17	1	08:00	900	1		3.74	63	
8	18	08:00	900	1		6.31	54	166	17	1	20:00	900	1		3.74	63	
8	18	20:00	900	1		6.31	54	166	17	2	08:00	900	1		3.74	63	
8	19	08:00	900	1		6.31	54	166	17	2	20:00	900	1		3.74	63	
8	19	20:00	900	1		6.31	54	166	17	3	07:55	0	0	8.36	3.30	66	
8	20	08:00	900	1		6.31	54	166	17	3	08:00	450	1		3.30	66	
8	20	20:00	900	1		6.31	54	166	17	3	20:00	450	1		3.30	66	
8	21	07:55	0	0	3.78	4.73	54	166	17	4	08:00	450	1		3.30	66	
8	21	08:00	900	1		4.73	54	166	17	4	20:00	450	1		3.30	66	
8	21	20:00	900	1		4.73	54	166	17	5	08:00	450	1		3.30	66	
8	22	08:00	900	1		4.73	54	166	17	5	20:00	450	1		3.30	66	
8	23	08:00	900	1		4.73	54	166	17	6	08:00	450	1		3.30	66	
8	24	08:00	900	1		4.73	54	166	17	6	20:00	450	1		3.30	66	
8	25	08:00	900	1		4.73	54	166	17	7	07:55	0	0	3.25	4.17	65	
8	26	08:00	900	1		4.73	54	166	17	7	08:00	900	1		4.17	65	
8	27	08:00	900	1		4.73	54	166	17	7	20:00	900	1		4.17	65	
8	28	07:55	0	0	0.63	4.05	52	166	17	8	08:00	900	1		4.17	65	
8	28	08:00	900	1		4.05	52	166	17	8	20:00	900	1		4.17	65	
8	29	08:00	900	1		4.05	52	166	17	9	08:00	900	1		4.17	65	

8	30	08:00	900	1		4.05	52	166	17	9	20:00	900	1		4.17	65
8	31	08:00	900	1		4.05	52	166	17	10	07:55	0	0	6.26	4.03	65
8	32	08:00	900	1		4.05	52	166	17	10	08:00	900	1		4.03	65
8	33	08:00	900	1		4.05	52	166	17	10	20:00	900	1		4.03	65
8	34	08:00	900	1		4.05	52	166	17	11	08:00	900	1		4.03	65
8	35	07:55	0	0	0.98	4.65	53	166	17	11	20:00	900	1		4.03	65
8	35	08:00	900	1		4.65	53	166	17	12	08:00	900	1		4.03	65
8	36	08:00	900	1		4.65	53	166	17	12	20:00	900	1		4.03	65
8	37	08:00	900	1		4.65	53	166	17	13	08:00	900	1		4.03	65
8	38	08:00	900	1		4.65	53	166	17	13	20:00	900	1		4.03	65
8	39	08:00	900	1		4.65	53	166	17	14	07:55	0	0	7.13	3.64	66
8	40	08:00	900	1		4.65	53	166	17	14	08:00	900	1		3.64	66
8	41	08:00	900	1		4.65	53	166	17	14	20:00	900	1		3.64	66
8	42	07:55	0	0	0.55	5.51	55	166	17	15	08:00	900	1		3.64	66
8	42	08:00	900	1		5.51	55	166	17	15	20:00	900	1		3.64	66
8	43	08:00	900	1		5.51	55	166	17	16	08:00	900	1		3.64	66
8	44	08:00	900	1		5.51	55	166	17	16	20:00	900	1		3.64	66
8	45	08:00	900	1		5.51	55	166	17	17	07:55	0	0	8.05	3.58	65
8	46	08:00	900	1		5.51	55	166	17	17	08:00	450	1		3.58	65
8	47	08:00	900	1		5.51	55	166	17	17	20:00	450	1		3.58	65
8	48	08:00	900	1		5.51	55	166	17	18	08:00	450	1		3.58	65
8	49	07:55	0	0	0.70	5.51	55	166	17	18	20:00	450	1		3.58	65
8	49	08:00	900	1		5.51	55	166	17	19	08:00	450	1		3.58	65
#9	0	08:00	450	1		2.84	50	168	17	19	20:00	450	1		3.58	65
9	1	08:00	450	1		2.84	50	168	17	20	08:00	450	1		3.58	65
9	2	08:00	450	1		2.84	50	168	17	20	20:00	450	1		3.58	65
9	3	07:55	0	0	0.75	2.96	49	168	17	21	07:55	0	0	4.54	4.31	65
9	3	08:00	450	1		2.96	49	168								
9	3	20:00	450	1		2.96	49	168								
9	4	08:00	450	1		2.96	49	168								
9	4	20:00	450	1		2.96	49	168								
9	5	08:00	450	1		2.96	49	168								
9	5	20:00	450	1		2.96	49	168								
9	6	08:00	450	1		2.96	49	168								
9	6	20:00	450	1		2.96	49	168								
9	7	07:55	0	0	3.09	2.96	52	168								
9	7	08:00	450	1		2.96	52	168								
9	7	20:00	450	1		2.96	52	168								
9	8	08:00	450	1		2.96	52	168								
9	8	20:00	450	1		2.96	52	168								
9	9	08:00	450	1		2.96	52	168								
9	9	20:00	450	1		2.96	52	168								
9	10	07:55	0	0	2.49	3.22	50	168								
9	10	08:00	450	1		3.22	50	168	9	24	08:00	450	1		3.08	51 168
9	10	20:00	450	1		3.22	50	168	9	25	08:00	450	1		3.08	51 168
9	11	08:00	450	1		3.22	50	168	9	26	08:00	450	1		3.08	51 168
9	11	20:00	450	1		3.22	50	168	9	27	08:00	450	1		3.08	51 168
9	12	08:00	450	1		3.22	50	168	9	28	08:00	450	1		3.29	51 168
9	12	20:00	450	1		3.22	50	168	9	29	08:00	450	1		3.29	51 168
9	13	08:00	450	1		3.22	50	168	9	30	08:00	450	1		3.29	51 168
9	13	20:00	450	1		3.22	50	168	9	31	08:00	450	1		3.29	51 168
9	14	07:55	0	0	2.25	3.02	50	168	9	32	08:00	450	1		3.29	51 168

9	14	08:00	450	1		3.02	50	168	9	33	08:00	450	1		3.29	51	168
9	14	20:00	450	1		3.02	50	168	9	34	08:00	450	1		3.29	51	168
9	15	08:00	450	1		3.02	50	168	9	35	07:55	0	0	2.42	3.29	51	168
9	15	20:00	450	1		3.02	50	168	9	35	08:00	450	1		2.42	50	168
9	16	08:00	450	1		3.02	50	168	9	36	08:00	450	1		2.42	50	168
9	16	20:00	450	1		3.02	50	168	9	37	08:00	450	1		2.42	50	168
9	17	07:55	0	0	2.43	3.08	51	168	9	38	08:00	450	1		2.42	50	168
9	17	08:00	450	1		3.08	51	168	9	39	08:00	450	1		2.42	50	168
9	17	20:00	450	1		3.08	51	168	9	40	08:00	450	1		2.42	50	168
9	18	08:00	450	1		3.08	51	168	9	41	08:00	450	1		2.42	50	168
9	18	20:00	450	1		3.08	51	168	9	42	07:55	0	0	0.30	2.42	50	168
9	19	08:00	450	1		3.08	51	168	9	42	08:00	450	1		1.90	51	168
9	19	20:00	450	1		3.08	51	168	9	43	08:00	450	1		1.90	51	168
9	20	08:00	450	1		3.08	51	168	9	44	08:00	450	1		1.90	51	168
9	20	20:00	450	1		3.08	51	168	9	45	08:00	450	1		1.90	51	168
9	21	07:55	0	0	2.32	3.08	51	168	9	46	08:00	450	1		1.90	51	168
9	21	08:00	450	1		3.08	51	168	9	47	08:00	450	1		1.90	51	168
9	21	20:00	450	1		3.08	51	168	9	48	08:00	450	1		1.90	51	168
9	22	08:00	450	1		3.08	51	168	9	49	07:55	0	0	0.06	1.90	51	168
9	23	08:00	450	1		3.08	51	168	9	49	08:00	450	1		1.90	51	168

8.3.3 Doseintervall-gruppen

#ID	DATE	TIME	AMT	MDV	CON	GFR	WT	HT	#ID	DATE	TIME	AMT	RATE	MDV	CON	GFR	WT	HT
#1-PO	0	20:00	450	1		2.43	69	169	#3-PO	0	08:00	170	0	1		2.24	68	164
1	1	08:00	450	0		2.43	69	169	3	1	08:00	170	0	1		2.24	68	164
1	1	20:00	450	1		2.43	69	169	3	2	08:00	170	0	1		2.24	68	164
1	2	08:00	450	1		2.43	69	169	3	3	10:15	168	0	1		2.39	67	164
1	2	20:00	450	1		2.43	69	169	3	4	07:50	0	0	0	0.68	2.39	67	164
1	3	08:30	0	0	3.25	2.53	69	169	3	4	08:30	168	0	1		2.39	67	164
1	3	08:35	450	1		2.53	69	169	3	4	09:30	0	0	0	6.64	2.39	67	164
1	3	09:30	0	0	3.23	2.53	69	169	3	4	11:00	0	0	0	3.13	2.39	67	164
1	3	11:00	0	0	6.34	2.53	69	169	3	4	12:55	0	0	0	2.54	2.39	67	164
1	3	14:00	0	0	5.11	2.53	69	169	3	5	08:00	168	0	1		2.39	67	164
1	3	20:00	450	1		2.53	69	169	3	6	08:00	168	0	1		2.39	67	164
1	4	08:00	450	1		2.53	69	169	3	7	08:00	168	0	1		2.23	67	164
1	4	20:00	450	1		2.53	69	169	3	8	08:00	168	0	1		2.23	67	164
1	5	08:00	450	1		2.53	69	169	3	9	08:00	168	0	1		2.23	67	164
1	5	20:00	450	1		2.53	69	169	3	10	08:00	170	0	1		3.09	68	164
1	6	08:00	450	1		2.53	69	169	3	11	08:00	170	0	1		3.09	68	164
1	6	20:00	450	1		2.53	69	169	3	12	08:00	170	0	1		3.09	68	164
1	7	08:00	450	1		2.53	69	169	3	13	08:00	170	0	1		3.09	68	164
1	7	20:00	450	1		2.44	69	169	3	14	08:00	170	0	1		2.96	68	164
1	8	08:00	450	1		2.44	69	169	3	15	08:00	170	0	1		2.96	68	164
1	8	20:00	450	1		2.44	69	169	3	16	08:00	170	0	1		2.96	68	164
1	9	08:00	450	1		2.44	69	169	3	17	08:25	173	0	1		3.02	69	164
1	9	20:00	450	1		2.44	69	169	3	18	07:45	0	0	0	0.51	3.02	69	164
1	10	08:00	450	1		2.44	69	169	3	18	08:40	173	0	1		3.02	69	164
1	10	20:00	450	1		2.54	69	169	3	18	09:45	0	0	0	5.56	3.02	69	164
1	11	08:00	450	1		2.54	69	169	3	18	11:00	0	0	0	3.18	3.02	69	164
1	11	20:00	450	1		2.54	69	169	3	18	13:00	0	0	0	2.39	3.02	69	164
1	12	08:00	450	1		2.54	69	169	3	19	08:00	173	0	1		3.02	69	164
1	12	20:00	450	1		2.54	69	169	3	20	08:00	173	0	1		3.02	69	164
1	13	08:00	450	1		2.54	69	169	3	21	08:00	173	0	1		3.47	69	164
1	13	20:00	450	1		2.54	69	169	3	22	08:00	450	0	1		3.47	69	164
1	14	08:00	450	1		2.54	69	169	3	23	08:00	450	0	1		3.47	69	164

1	15	08:00	450	1		2.24	68	169	3	24	08:00	450	0	1		3.47	69	164
1	16	08:00	450	1		2.24	68	169	3	25	08:00	450	0	1		3.47	69	164
1	17	08:00	450	1		2.68	69	169	3	26	08:00	450	0	1		3.47	69	164
1	17	20:00	450	1		2.68	69	169	3	27	08:00	450	0	1		3.47	69	164
1	18	08:00	450	1		2.68	69	169	3	28	08:00	450	0	1		3.32	70	164
1	18	21:00	450	1		2.68	69	169	3	29	08:00	450	0	1		3.32	70	164
1	19	08:05	0	0	1.63	2.68	69	169	3	30	08:00	450	0	1		3.32	70	164
1	19	08:10	450	1		2.68	69	169	3	31	08:00	450	0	1		3.32	70	164
1	19	09:00	0	0	3.39	2.68	69	169	3	32	08:00	450	0	1		3.32	70	164
1	19	10:53	0	0	5.42	2.68	69	169	3	33	08:00	450	0	1		3.32	70	164
1	19	13:38	0	0	3.63	2.68	69	169	3	34	08:00	450	0	1		3.32	70	164
1	19	20:00	450	1		2.68	69	169	3	35	08:00	450	0	1		3.29	70	164
1	20	08:00	450	1		2.68	69	169	3	36	08:00	450	0	1		3.29	70	164
1	20	20:00	450	1		2.68	69	169	3	37	08:00	450	0	1		3.29	70	164
1	21	08:00	450	1		2.68	69	169	3	38	08:00	450	0	1		3.29	70	164
1	21	20:00	450	1		2.79	69	169	3	39	08:00	450	0	1		3.29	70	164
1	22	08:00	450	1		2.79	69	169	3	40	08:00	450	0	1		3.29	70	164
1	23	08:00	450	1		2.79	69	169	3	41	07:45	0	0	0	0.30	3.29	70	164
1	24	08:00	450	1		2.79	69	169	3	41	08:00	450	0	1		3.29	70	164
1	25	08:00	450	1		2.79	69	169	3	41	09:05	0	0	0	1.66	3.29	70	164
1	26	08:00	450	1		2.79	69	169	3	41	10:00	0	0	0	3.94	3.29	70	164
1	27	08:00	450	1		2.79	69	169	3	41	13:00	0	0	0	2.54	3.29	70	164
1	28	08:00	450	1		2.46	68	169	3	42	08:00	450	0	1		3.69	71	164
1	29	08:00	450	1		2.46	68	169	3	43	08:00	450	0	1		3.69	71	164
1	30	08:00	450	1		2.46	68	169	3	44	08:00	450	0	1		3.69	71	164
1	31	08:00	450	1		2.46	68	169	3	45	08:00	450	0	1		3.69	71	164
1	32	08:00	450	1		2.46	68	169	3	46	08:00	450	0	1		3.69	71	164
1	33	08:00	450	1		2.46	68	169	3	47	08:00	450	0	1		3.69	71	164
1	34	08:00	450	1		2.46	68	169	3	48	08:00	450	0	1		3.69	71	164
1	35	08:00	450	1		2.57	69	169	3	49	08:00	450	0	1		3.69	71	164
1	36	08:00	450	1		2.57	69	169	#4-IV	0	20:00	465		1		4.50	93	183
1	37	08:00	450	1		2.57	69	169	4	1	08:00	465		1		4.50	93	183
1	38	08:00	450	1		2.57	69	169	4	1	17:25	465		1		4.50	93	183
1	39	08:00	450	1		2.57	69	169	4	2	08:00	0	0	0	1.91	4.50	93	183
1	40	08:00	450	1		2.57	69	169	4	2	08:15	465		1		4.50	93	183
1	41	08:00	450	1		2.57	69	169	4	2	09:15	0	0	0	14.3	4.50	93	183
1	42	08:00	450	1		2.17	69	169	4	2	11:00	0	0	0	6.37	4.50	93	183
1	43	08:00	450	1		2.17	69	169	4	2	13:00	0	0	0	4.89	4.50	93	183
1	44	08:00	450	1		2.17	69	169	4	2	20:00	465		1		4.50	93	183
1	45	08:00	450	1		2.17	69	169	4	3	08:00	466		1		4.88	93	183
1	46	08:00	450	1		2.17	69	169	4	3	20:00	466		1		4.88	93	183
1	47	08:00	450	1		2.17	69	169	4	4	08:00	466		1		4.88	93	183
1	48	07:35	0	0	1.67	2.17	69	169	4	4	20:00	466		1		4.88	93	183
1	48	07:40	450	1		2.17	69	169	4	5	08:00	466		1		4.88	93	183
1	48	08:20	0	0	1.61	2.17	69	169	4	5	20:00	466		1		4.88	93	183
1	48	10:00	0	0	4.44	2.17	69	169	4	6	08:00	466		1		4.88	93	183
1	48	14:15	0	0	2.49	2.17	69	169	4	6	20:00	466		1		4.88	93	183
1	49	08:00	450	1		2.17	69	169	4	7	08:00	462		1		4.56	92	183
#2-IV	0	20:00	450	1		3.32	55	168	4	7	20:00	462		1		4.56	92	183
2	1	08:00	450	1		3.32	55	168	4	8	08:00	462		1		4.56	92	183
2	1	21:00	450	1		3.32	55	168	4	8	20:00	462		1		4.56	92	183
2	2	08:50	0	0	1.32	3.32	55	168	4	9	08:00	462		1		4.56	92	183
2	2	08:55	450	1		3.32	55	168	4	9	20:00	462		1		4.56	92	183
2	2	09:50	0	0	1.33	3.32	55	168	4	10	08:00	470		1		4.67	94	183
2	2	11:50	0	0	1.16	3.32	55	168	4	10	20:00	470		1		4.67	94	183
2	2	13:50	0	0	3.23	3.32	55	168	4	11	08:00	470		1		4.67	94	183
2	2	20:00	450	1		3.32	55	168	4	11	20:00	470		1		4.67	94	183
2	3	08:00	450	1		3.56	54	168	4	12	08:00	470		1		4.67	94	183
2	3	20:00	450	1		3.56	54	168	4	12	20:00	470		1		4.67	94	183

2	4	08:00	450	1		3.56	54	168	4	13	08:00	470	1		4.67	94	183
2	4	20:00	450	1		3.56	54	168	4	13	20:00	470	1		4.67	94	183
2	5	08:00	450	1		3.56	54	168	4	14	08:00	470	1		4.64	94	183
2	5	20:00	450	1		3.56	54	168	4	14	20:00	470	1		4.64	94	183
2	6	08:00	450	1		3.56	54	168	4	15	08:00	470	1		4.64	94	183
2	6	20:00	450	1		3.56	54	168	4	15	20:00	470	1		4.64	94	183
2	7	08:00	900	1		3.46	53	168	4	16	08:00	470	1		4.64	94	183
2	7	20:00	900	1		3.46	53	168	4	16	20:00	470	1		4.64	94	183
2	8	08:00	900	1		3.46	53	168	4	17	08:00	470	1		5.03	94	183
2	8	20:00	900	1		3.46	53	168	4	17	20:00	470	1		5.03	94	183
2	9	08:00	900	1		3.46	53	168	4	18	08:00	470	1		5.03	94	183
2	9	20:00	900	1		3.46	53	168	4	18	20:00	470	1		5.03	94	183
2	10	08:00	900	1		3.46	53	168	4	19	08:00	470	1		5.03	94	183
2	10	20:00	900	1		2.77	53	168	4	19	17:40	470	1		5.03	94	183
2	11	08:00	900	1		2.77	53	168	4	20	07:45	0	0	2.30	5.03	94	183
2	11	20:00	900	1		2.77	53	168	4	20	09:10	470	1		5.03	94	183
2	12	08:00	900	1		2.77	53	168	4	20	09:55	0	0	15.6	5.03	94	183
2	12	20:00	900	1		2.77	53	168	4	20	11:55	0	0	7.59	5.03	94	183
2	13	08:00	900	1		2.77	53	168	4	20	14:00	0	0	6.03	5.03	94	183
2	13	20:00	900	1		2.77	53	168	4	20	20:00	470	1		5.03	94	183
2	14	08:00	450	1		2.59	52	168	4	21	08:00	470	1		4.70	94	183
2	14	20:00	450	1		2.59	52	168	4	21	20:00	470	1		4.70	94	183
2	15	08:00	450	1		2.59	52	168	4	22	08:00	900	1		4.70	94	183
2	15	20:00	450	1		2.59	52	168	4	23	08:00	900	1		4.70	94	183
2	16	08:00	450	1		2.59	52	168	4	24	08:00	900	1		4.70	94	183
2	16	20:00	450	1		2.59	52	168	4	25	08:00	900	1		4.70	94	183
2	17	08:00	450	1		2.82	53	168	4	26	08:00	900	1		4.70	94	183
2	17	20:00	450	1		2.82	53	168	4	27	08:00	900	1		4.70	94	183
2	18	08:00	450	1		2.82	53	168	4	28	08:00	900	1		5.05	95	183
2	18	20:00	450	1		2.82	53	168	4	29	08:00	900	1		5.05	95	183
2	19	08:00	450	1		2.82	53	168	4	30	08:00	900	1		5.05	95	183
2	19	20:00	450	1		2.82	53	168	4	31	08:00	900	1		5.05	95	183
2	20	08:00	450	1		2.82	53	168	4	32	08:00	900	1		5.05	95	183
2	20	21:00	450	1		2.82	53	168	4	33	08:00	900	1		5.05	95	183
2	21	08:10	0	0	2.45	2.82	53	168	4	34	08:00	900	1		5.05	95	183
2	21	08:15	450	1		2.82	53	168	4	35	08:00	900	1		5.15	97	183
2	21	09:15	0	0	6.89	2.82	53	168	4	36	08:00	900	1		5.15	97	183
2	21	11:10	0	0	5.69	2.82	53	168	4	37	08:00	900	1		5.15	97	183
2	21	13:15	0	0	4.62	2.82	53	168	4	38	08:00	900	1		5.15	97	183
2	22	08:00	450	1		2.82	53	168	4	39	08:00	900	1		5.15	97	183
2	23	08:00	450	1		2.82	53	168	4	40	08:00	900	1		5.15	97	183
2	24	08:00	450	1		2.82	53	168	4	41	08:00	900	1		5.15	97	183
2	25	08:00	450	1		2.82	53	168	4	42	08:05	0	0	1.43	5.22	99	183
2	26	08:00	450	1		2.82	53	168	4	42	08:10	900	1		5.22	99	183
2	27	08:00	450	1		2.82	53	168	4	42	09:10	0	0	5.63	5.22	99	183
2	28	08:00	450	1		2.61	54	168	4	42	11:10	0	0	4.09	5.22	99	183
2	29	08:00	450	1		2.61	54	168	4	42	13:10	0	0	3.08	5.22	99	183
2	30	08:00	450	1		2.61	54	168	4	43	08:00	900	1		5.22	99	183
2	31	08:00	450	1		2.61	54	168	4	44	08:00	900	1		5.22	99	183
2	32	08:00	450	1		2.61	54	168	4	45	08:00	900	1		5.22	99	183
2	33	08:00	450	1		2.61	54	168	4	46	08:00	900	1		5.22	99	183
2	34	09:00	450	1		2.61	54	168	4	47	08:00	900	1		5.22	99	183
2	35	08:00	0	0	0.88	3.00	55	168	4	48	08:00	900	1		5.22	99	183
2	35	08:05	450	1		3.00	55	168	4	49	08:00	900	1		5.22	99	183
2	35	09:05	0	0	6.24	3.00	55	168									
2	35	11:05	0	0	4.31	3.00	55	168									
2	35	13:00	0	0	3.51	3.00	55	168									
2	36	08:00	450	1		3.00	55	168									
2	37	08:00	450	1		3.00	55	168									

2	38	08:00	450	1	3.00	55	168
2	39	08:00	450	1	3.00	55	168
2	40	08:00	450	1	3.00	55	168
2	41	08:00	450	1	3.00	55	168
2	42	08:00	450	1	2.98	55	168
2	43	08:00	450	1	2.98	55	168
2	44	08:00	450	1	2.98	55	168
2	45	08:00	450	1	2.98	55	168
2	46	08:00	450	1	2.98	55	168
2	47	08:00	450	1	2.98	55	168
2	48	08:00	450	1	2.98	55	168
2	49	08:00	450	1	2.98	55	168