

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
21. November 2013 (21.11.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/171024 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/64 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/058195

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. April 2013 (19.04.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2012 009 780.8 18. Mai 2012 (18.05.2012) DE

(71) Anmelder: LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH
[DE/DE]; Ernst-Leitz-Straße 17-37, 35578 Wetzlar (DE).

(72) Erfinder: SCHNEIDER, Jürgen; Kreuzaecker 54, 74889
Sinsheim (DE). WIDZGOWSKI, Bernd; Bahnhofstrasse
6, 69221 Dossenheim (DE). SIEBER, Jochen;
Windeckstrasse 29, 68163 Mannheim (DE). FOUQUET,
Wernher; Verschäffeltstrasse 26, 68167 Mannheim (DE).
FRIEDRICH, Lars; Karl-Mathy-Strasse 5, 68167
Mannheim (DE). GISKE, Arnold; Turnerstrasse 35,
69126 Heidelberg (DE). KUSCHEL, Lioba; Eberbacher-
Strasse 71, 68259 Mannheim (DE).

(74) Anwälte: GRABOVAC, Dalibor et al.; GH-Patent,
Badweg 3, 65307 Bad Schwalbach (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR EXAMINING A SAMPLE WITH REGARD TO THE LIFETIME OF AN EXCITED
STATE

(54) Bezeichnung : VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM UNTERSUCHEN EINER PROBE IN BEZUG AUF DIE
LEBENSDAUER EINES ANGEREGTEN ZUSTANDS

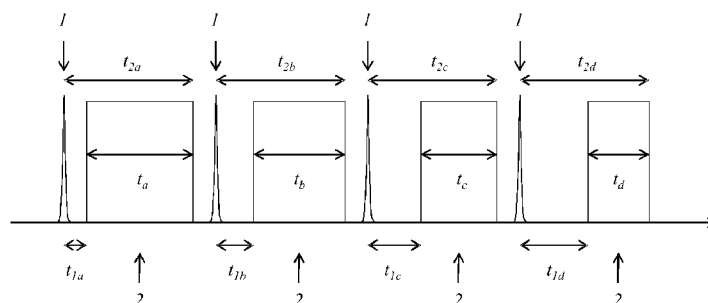


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to a method for examining a sample with regard to the lifetime of an excited state, in particular a fluorescence lifetime, and/or with regard to a property of a sample that is correlated with a lifetime of an excited state, in particular a fluorescence lifetime, wherein a sample region is illuminated with a sequence of excitation light pulses. The method is characterized in that in each case the quantity of light and/or the number of photons of the detection light, in particular fluorescent light, emerging from the sample region are/is measured temporarily between the excitation light pulses in each case exclusively within a detection time window, wherein at least two detection time windows have different temporal lengths.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2013/171024 A1



Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

betrifft ein Verfahren zum Untersuchen einer Probe in Bezug auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, und/oder in Bezug auf einen mit einer Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, korrelierten Eigenschaft einer Probe, wobei ein Probenbereich mit einer Folge von Anregungslichtpulsen beleuchtet wird. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass zeitlich zwischen den Anregungslichtpulsen jeweils ausschließlich innerhalb eines Detektionszeitfensters jeweils die Lichtmenge und/oder die Anzahl der Photonen des von dem Probenbereich ausgehenden Detektionslichtes, insbesondere Fluoreszenzlichtes, gemessen wird, wobei wenigstens zwei Detektionszeitfenster zeitlich unterschiedlich lang sind.

VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM UNTERSUCHEN EINER PROBE IN BEZUG AUF DIE
LEBENSDAUER EINES ANGEREGTEN ZUSTANDS

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Untersuchen einer Probe in Bezug auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, und/oder in Bezug auf einen mit einer Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, korrelierten Eigenschaft einer Probe, wobei ein Probenbereich mit einer Folge von Anregungslichtpulsen beleuchtet wird, und eine Vorrichtung zur Ausführung eines solchen Verfahrens.

Die Erfindung betrifft außerdem eine Vorrichtung, Mikroskop, insbesondere Scanmikroskop, insbesondere konfokales Scanmikroskop, zum Untersuchen einer Probe in Bezug auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, und/oder in Bezug auf einen mit einer Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, korrelierten Eigenschaft einer Probe, mit einer Lichtquelle, die eine Folge von Anregungslichtpulsen zum Beleuchten eines Probenbereichs einer Probe erzeugt.

Durch Untersuchen der Lebensdauer der angeregten Zustände einer mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen markierten Probe können wichtige Erkenntnisse über die Eigenschaften der Probe gewonnen werden. Insbesondere bei der Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe können mithilfe der Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) beispielsweise Erkenntnisse über einen untersuchten Probenbereich, wie die Zusammensetzung oder dessen Umgebung, gewonnen werden. So kann beispielsweise in der Zellbiologie durch

Messung der Lebensdauer der Fluoreszenzfarbstoffe indirekt auf die Kalziumkonzentration in einem Probenbereich geschlossen werden.

- FLIM ist insbesondere eine Technik, mit welcher die unterschiedlichen Fluoreszenzabklingzeiten (z.B. verursacht durch Verwendung
5 verschiedener Farbstoffe oder durch unterschiedliche Mikroumgebung) als Kontrast in einem mikroskopischen Bild dargestellt werden können. Dabei werden Pixel für Pixel die Fluoreszenzabklingzeiten gemessen dargestellt, wobei beispielsweise Pixeln mit unterschiedlichen Fluoreszenzabklingzeiten unterschiedliche Farben zugeordnet werden.
- 10 Es gibt eine Reihe von Methoden zur Messung der Lebensdauer der angeregten Zustände von Fluoreszenzfarbstoffen. Einige dieser Methoden sind in den Kapiteln 4 und 5 des Lehrbuchs von Joseph R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Kluwer Academic/Plenum Publishers, second edition, 1999, ausführlich
15 beschrieben. Beispielsweise ist es möglich, die Leistung des Anregungslichtes zeitlich zu modulieren, um aus der Phasenverzögerung des Emissionslichtes auf die Lebensdauer des angeregten Zustandes zu schließen.
- Es ist auch möglich, die Fluoreszenzfarbstoffe mit kurzen Lichtpulsen
20 anzuregen, um elektronisch den zeitlichen Versatz der Emissionslichtpulse zu messen. Beispielsweise ist aus DE 10 2004 017 956 A1 ein Mikroskop zur Untersuchung der Lebensdauer angeregter Zustände in einer Probe mit mindestens einer Lichtquelle, die Anregungslicht erzeugt, und mit mindestens einem Detektor, der von der
25 Probe ausgehendes Detektionslicht empfängt, bekannt. Das Mikroskop ist dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle einen Halbleiterlaser beinhaltet, der gepulstes Anregungslicht emittiert, wobei eine Einstellvorrichtung zur Einstellung der Pulsrepetitionsrate auf die spezifischen Lebensdauereigenschaften der Probe vorgesehen ist.

Insbesondere die zur Datenauswertung erforderliche Elektronik wird – oft in Form von PC-Einsteckkarten – kommerziell angeboten. Eine solche Zeitmesskarte ist jedoch sehr aufwändig und teuer.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren
5 anzugeben, das es erlaubt, auf einfache Weise Rückschlüsse in Bezug auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, und/oder in Bezug auf einen mit einer Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, korrelierten Eigenschaft einer Probe ziehen zu
10 können.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass zeitlich zwischen den Anregungslichtpulsen jeweils innerhalb eines Detektionszeitfensters die Lichtmenge und/oder die Anzahl der Photonen des von dem Probenbereich ausgehenden
15 Detektionslichtes, insbesondere Fluoreszenzlichtes, gemessen wird.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Vorrichtung anzugeben, die einfach aufgebaut sein kann und die es erlaubt, Rückschlüsse in Bezug auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, und/oder in Bezug auf einen
20 mit einer Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, korrelierten Eigenschaft einer Probe ziehen zu können.

Diese Aufgabe wird durch eine Vorrichtung gelöst, die dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Detektor zeitlich zwischen den
25 Anregungslichtpulsen jeweils innerhalb eines Detektionszeitfensters die Lichtmenge und/oder die Anzahl der Photonen des von dem Probenbereich ausgehenden Detektionslichtes, insbesondere Fluoreszenzlichtes, misst.

Bei einer besonderen Ausführungsform ist vorgesehen, dass wenigstens
30 zwei der Detektionszeitfenster zeitlich unterschiedlich lang sind und/oder

dass wenigstens zwei zeitlich zwischen unterschiedlichen Anregungslichtpulsen angeordnete Detektionszeitfenster zeitlich unterschiedlich lang sind. Insbesondere kann vorgesehen sein, dass eine Steuerungsvorrichtung während eines Beleuchtens eines Probenbereichs mit der Folge von Anregungslichtpulsen die Dauer der Detektionszeitfenster verändert.

Es kann insbesondere vorgesehen sein, dass ein Detektionszeitfensterbeginn eines Detektionszeitfenster durch einen ersten zeitlichen Abstand zu dem vorausgegangenen Anregungslichtpuls definiert ist und dass ein Detektionszeitfensterende durch einen zweiten zeitlichen Abstand zu dem vorausgegangenen Anregungslichtpuls definiert ist.

Bei einer besonders einfach umsetzbaren Ausführung ist vorgesehen, dass die zweiten zeitlichen Abstände der Detektionszeitfenster zum vorausgegangenen Anregungslichtpuls gleich sind und dass während des Beleuchtens mit der Folge von Anregungslichtpulsen der erste zeitliche Abstand zur Erzeugung ungleich langer Detektionszeitfenster verändert, insbesondere vergrößert, wird.

Zur Ausführung des Verfahrens ist es vollkommen ausreichend, wenn zwischen zwei Anregungslichtpulsen ausschließlich jeweils ein einziges Detektionszeitfenster vorgesehen ist.

Insbesondere kann vorgesehen sein, dass jede gemessene Lichtmenge oder jede Photonenanzahl jeweils wenigstens einer das dazugehörige Detektionszeitfenster charakterisierenden Größe zugeordnet wird und/oder dass jede gemessene Lichtmenge oder jede Photonenanzahl jeweils dem Detektionszeitfensterbeginn des jeweils dazugehörigen Detektionszeitfensters zugeordnet wird, insbesondere wenn die zweiten Abstände der Detektionszeitfenster zum jeweils vorausgegangenen Anregungslichtpuls gleich sind. Insbesondere kann vorgesehen sein, dass durch die Zuordnung eine Menge von n-Tupeln für die weitere Auswertung gebildet wird.

Auf diese Weise wird das Integral über die Abklingkurve sukzessive abgetastet. Durch Bilden der zeitlichen Ableitung kann dann auf den Verlauf der Abklingkurve geschlossen werden.

Beispielsweise durch ein Vergrößern des ersten zeitlichen Abstandes des
5 Detektionszeitfensterbeginns zu dem jeweils vorausgegangenen Anregungslichtpuls bei gleichbleibenden zweiten Abständen der Detektionszeitfensterenden zu den jeweils vorausgegangenen Anregungslichtpulsen ist es ermöglicht, das Abklingverhalten eines Angeregten Zustandes bzw. der Angeregten Zustände der im
10 Probenbereich befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe auf einfache Weise zu charakterisieren. Durch das Konstanthalten der zweiten zeitlichen Abstände ist jedes Detektionszeitfenster durch eine einzige Größe, nämlich durch den Detektionszeitfensterbeginn, vollständig beschrieben. Dies ermöglicht es, die jeweils gemessene Lichtmenge bzw. die jeweils
15 gemessene Photonenzahl lediglich einer einzigen Größe zuordnen zu müssen, so dass durch die Bildung von 2er-Tupeln das zeitliche Verhalten der Probe im Beleuchteten Bereich als Antwort auf die Anregungslichtpulse festgehalten und weiter ausgewertet werden kann.

Die Menge der durch die Zuordnung gebildeten n-Tupel, insbesondere
20 2er-Tupel, kann beispielsweise durch numerische Verfahren in Bezug auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, und/oder in Bezug auf einen mit einer Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, korrelierten Eigenschaft einer Probe ausgewertet
25 werden.

Wie bereits erwähnt kann beispielsweise vorgesehen sein, dass, insbesondere zur Ermittlung einer Fluoreszenzabklingkurve, die numerische zeitliche Ableitung aus der Menge der einander zugeordneten Tupel gebildet werden. Es ist auch möglich, aus den Ermittelten Tupeln zunächst auf den
30 Verlauf einer durch die Tupel festgelegten Kurve zu schließen und dies dann zeitlich abzuleiten.

Es kann auch vorgesehen sein, dass aus der Menge der einander zugeordneten Tupel eine Abklinglebenszeit und/oder eine Fluoreszenzhalbwertszeit ermittelt werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass aus den gewonnenen Daten, insbesondere aus den n-Tupeln, die Zeitabstände ermittelt werden, innerhalb der die Zahl der detektieren Photonen auf $1/e$ bzw. um die Hälfte abgenommen hat.

Insbesondere um die Vergleichbarkeit der innerhalb der Detektionszeitfenster detektierten Lichtmengen bzw. Photonenzahlen zu gewährleisten ist vorzugsweise vorgesehen, dass die Anregungslichtpulse, insbesondere hinsichtlich Pulsdauer und Pulsenergie, gleich sind und/oder dass die zeitlichen Abstände der Anregungslichtpulse gleich sind. Insbesondere können Vorrichtungen zur Regelung der Pulsdauer und/oder zur Regelung der Lichtleistung vorgesehen sein, die diese Randbedingungen gewährleisten. Alternativ kann auch vorgesehen sein, dass Schwankungen betreffend der Eigenschaften der Anregungslichtpulse gemessen werden und bei der Auswertung zur Korrektur der gewonnenen Daten berücksichtigt werden.

Besonders vielseitig einsetzbar ist eine Ausführung, bei der die Anregungslichtpulse mit einem Weißlichtlaser, insbesondere einem Weißlichtlaser, der eine Photonic-Band-Gap-Faser oder eine Photonic-Crystal-Faser aufweist, erzeugt werden. Dies hat den Vorteil, dass weitgehend für jeden Fluoreszenzfarbstoff Licht der geeigneten Anregungslichtwellenlänge zur Verfügung gestellt werden kann. Es ist natürlich auch möglich, die Probe simultan mit Licht mehrerer Wellenlängen zu beaufschlagen, beispielsweise wenn die Probe mehrere unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe beinhaltet.

Eine besonders präzise Detektion der jeweiligen Lichtmenge bzw. Photonenzahl ist möglich, wenn das Detektionslicht mit einem Hybriddetektor detektiert wird. Insbesondere kann vorgesehen sein, dass das Detektionslicht mit einem Detektor detektiert wird, der eine Photokathode, aufweist, der ein Elektronenbeschleuniger und/oder ein Elektronenvervielfacher und anschließend eine Avalanchediode nachgeschaltet ist. Insbesondere

solche Detektoren weisen Eigenschaften auf, die eine besonders präzise Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ermöglichen; nämlich einen großen Dynamikbereich, eine große Empfindlichkeit und ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

- 5 Bei einer besonders vorteilhaften Ausführung wird das Verfahren mit einem Scanmikroskop, insbesondere einem konfokalen Scanmikroskop, das beispielsweise eine Scaneinrichtung zum Lenken des Anregungslichtes und/oder des Detektionslichtes aufweisen kann, ausgeführt. Auf diese Weise ist es möglich, FLIM-Abbildungen des
10 beleuchteten Probenbereichs zu erzeugen und dem Benutzer auf einem Display anzuzeigen.

- Im Hinblick auf die erfindungsgemäße Vorrichtung kann insbesondere eine, vorzugsweise elektronische Steuerungsvorrichtung vorgesehen sein, die die zweiten Abstände der Detektionszeitfenster zum
15 vorausgegangenen Anregungslichtpuls gleich hält und während des Beleuchtens mit der Folge von Anregungslichtpulsen den ersten Abstand, als den jeweiligen Detektionszeitfensterbeginn, verändert, insbesondere vergrößert.

- Darüber hinaus kann auch vorgesehen sein, dass die
20 Steuerungsvorrichtung oder eine Auswertevorrichtung jede gemessene Lichtmenge oder jede Photonenanzahl jeweils wenigstens einer das dazugehörige Detektionszeitfenster charakterisierenden Größe zuordnet und/oder dass die Steuerungsvorrichtung jede gemessene Lichtmenge oder jede Photonenanzahl jeweils dem Detektionszeitfensterbeginn des jeweils
25 dazugehörigen Detektionszeitfensters zuordnet, letzteres insbesondere wenn die zweiten Abstände der Detektionszeitfenster zum jeweils vorausgegangenen Anregungslichtpuls gleich sind.

Insbesondere zur Ermittlung einer Fluoreszenzabklingkurve, kann vorteilhaft vorgesehen sein, dass die Steuerungsvorrichtung oder eine

Auswertevorrichtung die zeitliche Ableitung und/oder die numerische zeitliche Ableitung aus der Menge der einander zugeordneten Tupel errechnet.

Es kann auch vorgesehen sein, dass die Steuerungsvorrichtung oder eine Auswertevorrichtung aus der Menge der einander zugeordneten Tupel eine
5 Abklinglebenszeit und/oder eine Fluoreszenzhalbwertszeit ermittelt.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleiche oder gleich wirkende Elemente zumeist mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

10 Fig. 1 Schematisch eine Illustration der zeitlichen Anordnung und Dimension der Anregungslichtpulse und der Detektionszeitfenster in Bezug auf ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Verfahrens,

Fig. 2 bis 9 Schematisch das Prinzip der Messwertgewinnung und Datenauswertung in Bezug auf ein Ausführungsbeispiel eines
15 erfindungsgemäßen Verfahrens.

Figur 1 zeigt schematisch eine Illustration der zeitlichen Anordnung und Dimension der Anregungslichtpulse 1 und der Detektionszeitfenster 2 in Bezug auf ein mögliches Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen
20 Verfahrens.

Die Anregungslichtpulse 1 zur Beleuchtung eines Probenbereichs einer Probe beispielsweise mit einem konfokalen Scanmikroskop werden mit konstanter Repetitionsrate emittiert und weisen alle dieselbe Pulsdauer, sowie dieselbe Pulslichtleistung auf.

25 Zeitlich zwischen den Anregungslichtpulsen 1 und ausschließlich jeweils innerhalb eines auf einen Anregungslichtpuls 1 folgenden Detektionszeitfensters 2 wird jeweils die Lichtmenge und/oder die Anzahl der Photonen des von dem Probenbereich ausgehenden Detektionslichtes, insbesondere Fluoreszenzlichtes, gemessen, wobei sich die zeitlichen Längen
30 der Detektionszeitfenster t_a , t_b , t_c und t_d voneinander unterscheiden.

Der Detektionszeitfensterbeginn eines Detektionszeitfenster ist jeweils durch einen ersten zeitlichen Abstand t_{1a} , t_{1b} , t_{1c} , t_{1d} zu dem jeweils vorausgegangenen Anregungslichtpuls 1 definiert. Das Detektionszeitfensterende ist jeweils durch einen zweiten zeitlichen Abstand
5 t_{2a} , t_{2b} , t_{2c} , t_{2d} zu dem vorausgegangenen Anregungslichtpuls definiert, wobei die zeitlichen Abstände t_{2a} , t_{2b} , t_{2c} , t_{2d} zu dem vorausgegangenen Anregungslichtpuls in diesem Ausführungsbeispiel stets gleich sind.

Während des Beleuchtens mit der Folge von Anregungslichtpulsen 1 wird der erste zeitliche Abstand t_{1a} , t_{1b} , t_{1c} , t_{1d} zur Erzeugung ungleich langer
10 Detektionszeitfenster 2 zunehmend vergrößert und dadurch die zeitlichen Längen der Detektionszeitfenster t_a , t_b , t_c , t_d verringert.

Die Figuren 2 bis 9 illustrieren, wie durch Messung der Lichtmenge und/oder der Anzahl der Photonen des Detektionslichtes in jedem Detektionszeitfenster 2 das zeitliche Integral 3 der Fluoreszenzabklingkurve 4 – ausgehend von
15 zunächst langen Detektionszeitfenstern 2 (Figur 2) und übergehend zu zunehmend kürzer werdenden Detektionszeitfenstern 2 (Figuren 3 bis 9) sukzessive abgetastet wird.

Jede gemessene Lichtmenge oder jede gemessene Photonenanzahl wird jeweils wenigstens einer das dazugehörige Detektionszeitfenster
20 charakterisierenden Größe, nämlich jeweils dem Detektionszeitfensterbeginn zugeordnet und so 2er-Tupel von Messdaten erzeugt, die in den Figuren 2 bis 9 als Kreuze auf der Integralkurve 3 eingezeichnet sind.

Beispielsweise durch Interpolation kann auf den Verlauf der Integralkurve 3 geschlossen werden. Durch numerisches Ableiten nach der Zeit unter
25 Verwendung der 2er-Tupel oder durch zeitliches Ableiten der ermittelten Integralkurve 3 kann auf die Fluoreszenzabklingkurve 4 und damit auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, und/oder auf eine mit einer Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer,
30 korrelierten Eigenschaft einer Probe geschlossen werden.

Insbesondere ist es möglich mit Hilfe der gemessenen und/oder errechneten Größen eine FLIM-Abbildung eines Probenbereiches zu erzeugen.

- Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und
- 5 Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	Anregungslichtpulse
	2	Detektionszeitfenster
5	3	Integral der Fluoreszenzabklingkurve 4
	4	Fluoreszenzabklingkurve
	t_a, t_b, t_c, t_d	zeitliche Länge des Detektionszeitfensters
	$t_{1a}, t_{1b}, t_{1c}, t_{1d}$	erster zeitlicher Abstand
	$t_{2a}, t_{2b}, t_{2c}, t_{2d}$	zweiter zeitlicher Abstand

Patentansprüche

1. Verfahren zum Untersuchen einer Probe in Bezug auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, und/oder in Bezug auf einen mit einer
5 Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, korrelierten Eigenschaft einer Probe, wobei ein Probenbereich mit einer Folge von Anregungslichtpulsen beleuchtet wird, dadurch gekennzeichnet, dass zeitlich zwischen den Anregungslichtpulsen jeweils innerhalb eines Detektionszeitfensters die
10 Lichtmenge und/oder die Anzahl der Photonen des von dem Probenbereich ausgehenden Detektionslichtes, insbesondere Fluoreszenzlichtes, gemessen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a. wenigstens zwei Detektionszeitfenster zeitlich unterschiedlich
15 lang sind und/oder dass
 - b. wenigstens zwei zeitlich zwischen unterschiedlichen Anregungslichtpulsen angeordnete Detektionszeitfenster zeitlich unterschiedlich lang sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein
20 Detektionszeitfensterbeginn eines Detektionszeitfenster durch einen ersten zeitlichen Abstand zu dem vorausgegangenen Anregungslichtpuls definiert ist und dass ein Detektionszeitfensterende durch einen zweiten zeitlichen Abstand zu dem vorausgegangenen Anregungslichtpuls definiert ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die
25 zweiten zeitlichen Abstände der Detektionszeitfenster zum vorausgegangenen Anregungslichtpuls gleich sind und dass während des Beleuchtens mit der Folge von Anregungslichtpulsen der erste zeitliche Abstand zur

Erzeugung ungleich langer Detektionszeitfenster verändert, insbesondere vergrößert, wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen zwei Anregungslichtpulsen ausschließlich
5 jeweils ein einziges Detektionszeitfenster vorgesehen ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass

10 a. jede gemessene Lichtmenge oder jede Photonenanzahl jeweils wenigstens einer das dazugehörige Detektionszeitfenster charakterisierenden Größe, insbesondere Zeitgröße, zugeordnet wird und/oder dass

15 b. jede gemessene Lichtmenge oder jede Photonenanzahl jeweils dem Detektionszeitfensterbeginn des jeweils dazugehörigen Detektionszeitfensters zugeordnet wird, insbesondere wenn die zweiten zeitlichen Abstände der Detektionszeitfenster zum jeweils vorausgegangenen Anregungslichtpuls gleich sind.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass, insbesondere zur Ermittlung einer Fluoreszenzabklingkurve, die zeitliche Ableitung und/oder die numerische zeitliche Ableitung aus der Menge der
20 einander zugeordneten Tupel gebildet werden.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass aus der Menge der einander zugeordneten Tupel eine Abklinglebenszeit und/oder eine Fluoreszenzhalbwertszeit ermittelt werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungslichtpulse, insbesondere hinsichtlich
25 Pulsdauer und Pulsenergie, gleich sind und/oder dass die zeitlichen Abstände der Anregungslichtpulse gleich sind.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungslichtpulse mit einem Weißlichtlaser, insbesondere einem Weißlichtlaser, der eine Photonic-Band-Gap-Faser oder eine Photonic-Cristal-Faser aufweist, erzeugt werden.
- 5 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. das Detektionslicht mit einem Hybriddetektor detektiert wird und/oder dass
 - 10 b. das Detektionslicht mit einem Detektor detektiert wird, der eine Photokathode, aufweist, der ein Elektronenbeschleuniger und/oder ein Elektronenvervielfacher und anschließend eine Avalanchediode nachgeschaltet ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das eine Scaneinrichtung zum Lenken des
- 15 Anregungslichtes und/oder des Detektionslichtes verwendet wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine FLIM-Abbildung des Probenbereichs erzeugt wird.
14. Vorrichtung, Mikroskop, insbesondere Scanmikroskop, insbesondere
- 20 konfokales Scanmikroskop, zur Ausführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13.
15. Vorrichtung, Mikroskop, insbesondere Scanmikroskop, insbesondere konfokales Scanmikroskop, zum Untersuchen einer Probe in Bezug auf die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer
- 25 Fluoreszenzlebensdauer, und/oder in Bezug auf einen mit einer Lebensdauer eines angeregten Zustandes, insbesondere einer Fluoreszenzlebensdauer, korrelierten Eigenschaft einer Probe, mit einer Lichtquelle, die eine Folge von Anregungslichtpulsen zum Beleuchten

eines Probenbereichs einer Probe erzeugt, dadurch gekennzeichnet, dass ein Detektor zeitlich zwischen den Anregungslichtpulsen jeweils innerhalb eines Detektionszeitfensters die Lichtmenge und/oder die Anzahl der Photonen des von dem Probenbereich ausgehenden Detektionslichtes, insbesondere Fluoreszenzlichtes, misst.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass, eine Steuerungsvorrichtung während eines Beleuchtens eines Probenbereichs mit der Folge von Anregungslichtpulsen die Dauer der Detektionszeitfenster verändert.

17. Vorrichtung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass ein Detektionszeitfensterbeginn eines Detektionszeitfenster durch einen ersten zeitlichen Abstand zu dem vorausgegangenen Anregungslichtpuls definiert ist und dass ein Detektionszeitfensterende durch einen zweiten zeitlichen Abstand zu dem vorausgegangenen Anregungslichtpuls definiert ist und dass die zweiten Abstände der Detektionszeitfenster zum vorausgegangenen Anregungslichtpuls gleich sind und dass die Steuerungsvorrichtung während des Beleuchtens mit der Folge von Anregungslichtpulsen den ersten Abstand verändert, insbesondere vergrößert.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass

a. die Steuerungsvorrichtung oder eine Auswertevorrichtung jede gemessene Lichtmenge oder jede Photonenanzahl jeweils wenigstens einer das dazugehörige Detektionszeitfenster charakterisierenden Größe zuordnet und/oder dass

b. die Steuerungsvorrichtung oder eine Auswertevorrichtung jede gemessene Lichtmenge oder jede Photonenanzahl jeweils dem Detektionszeitfensterbeginn des jeweils dazugehörigen Detektionszeitfensters zuordnet, insbesondere wenn die

zweiten Abstände der Detektionszeitfenster zum jeweils vorausgegangenen Anregungslichtpuls gleich sind.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass, insbesondere zur Ermittlung einer Fluoreszenzabklingkurve, die
5 Steuerungsvorrichtung oder eine Auswertevorrichtung die zeitliche Ableitung und/oder die numerische zeitliche Ableitung aus der Menge der einander zugeordneten Tupel errechnet.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Steuerungsvorrichtung oder eine
10 Auswertevorrichtung aus der Menge der einander zugeordneten Tupel eine Abklinglebenszeit und/oder eine Fluoreszenzhalbwertszeit ermittelt.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungslichtpulse, insbesondere hinsichtlich Pulsdauer und Pulsenergie, gleich sind und/oder dass die zeitlichen
15 Abstände der Anregungslichtpulse gleich sind.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle einen Weißlichtlaser aufweist und/oder dass die Lichtquelle eine Photonic-Band-Gap-Faser oder eine Photonic-Cristal-Faser aufweist.
- 20 23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor als Hybriddetektor ausgebildet ist und/oder dass der Detektor eine Photokathode, aufweist, der ein Elektronenbeschleuniger und/oder ein Elektronenvervielfacher und anschließend eine Avalanchediode nachgeschaltet ist.
- 25 24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass eine Auswertevorrichtung eine FLIM-Abbildung des beleuchteten Probenbereichs erzeugt.

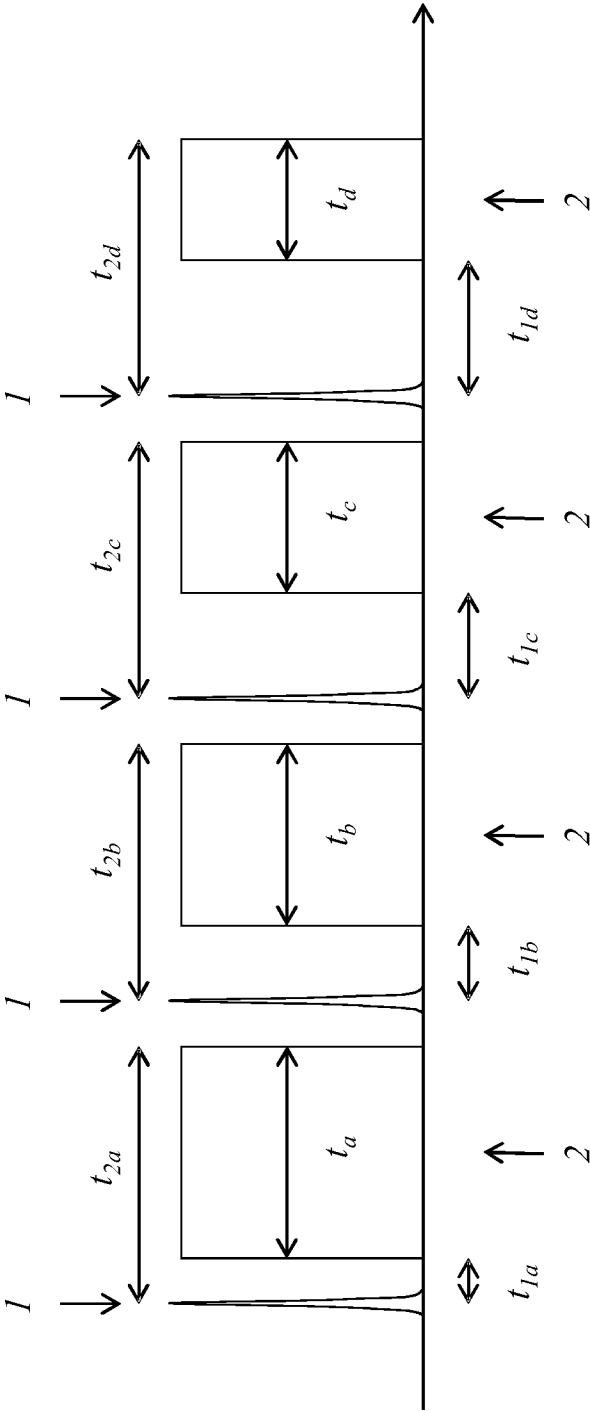


Fig. 1

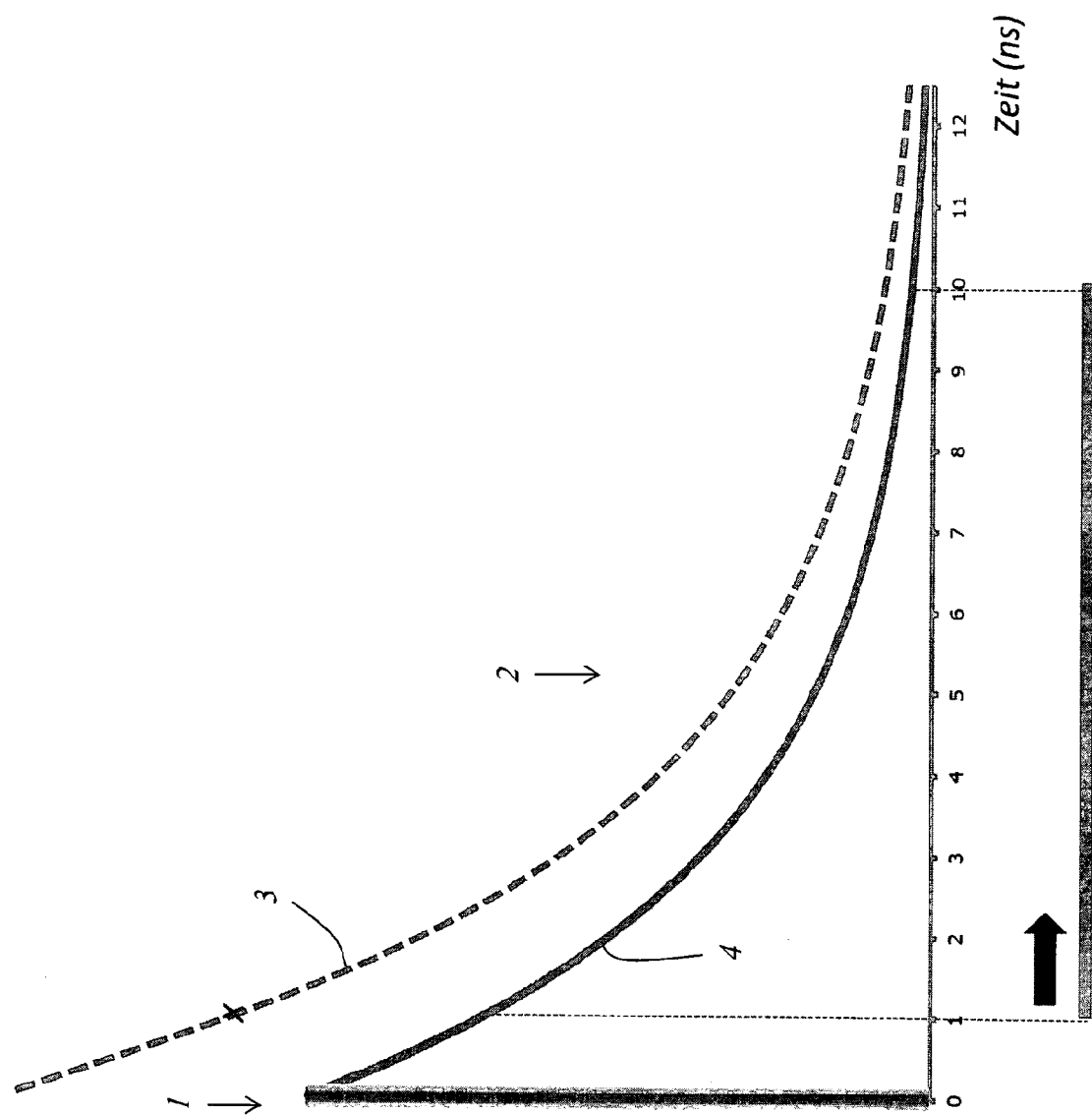


Fig. 2

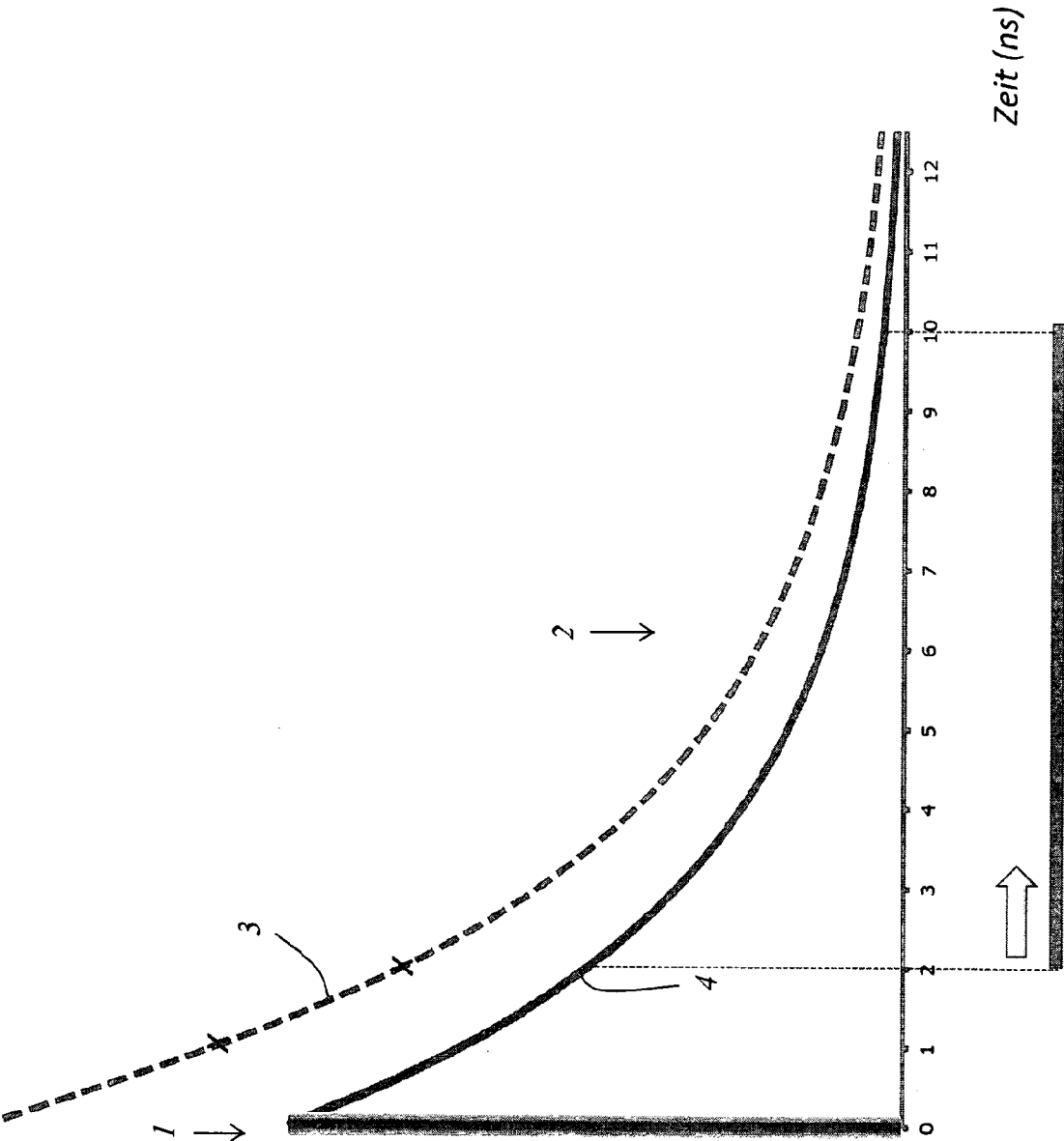


Fig. 3

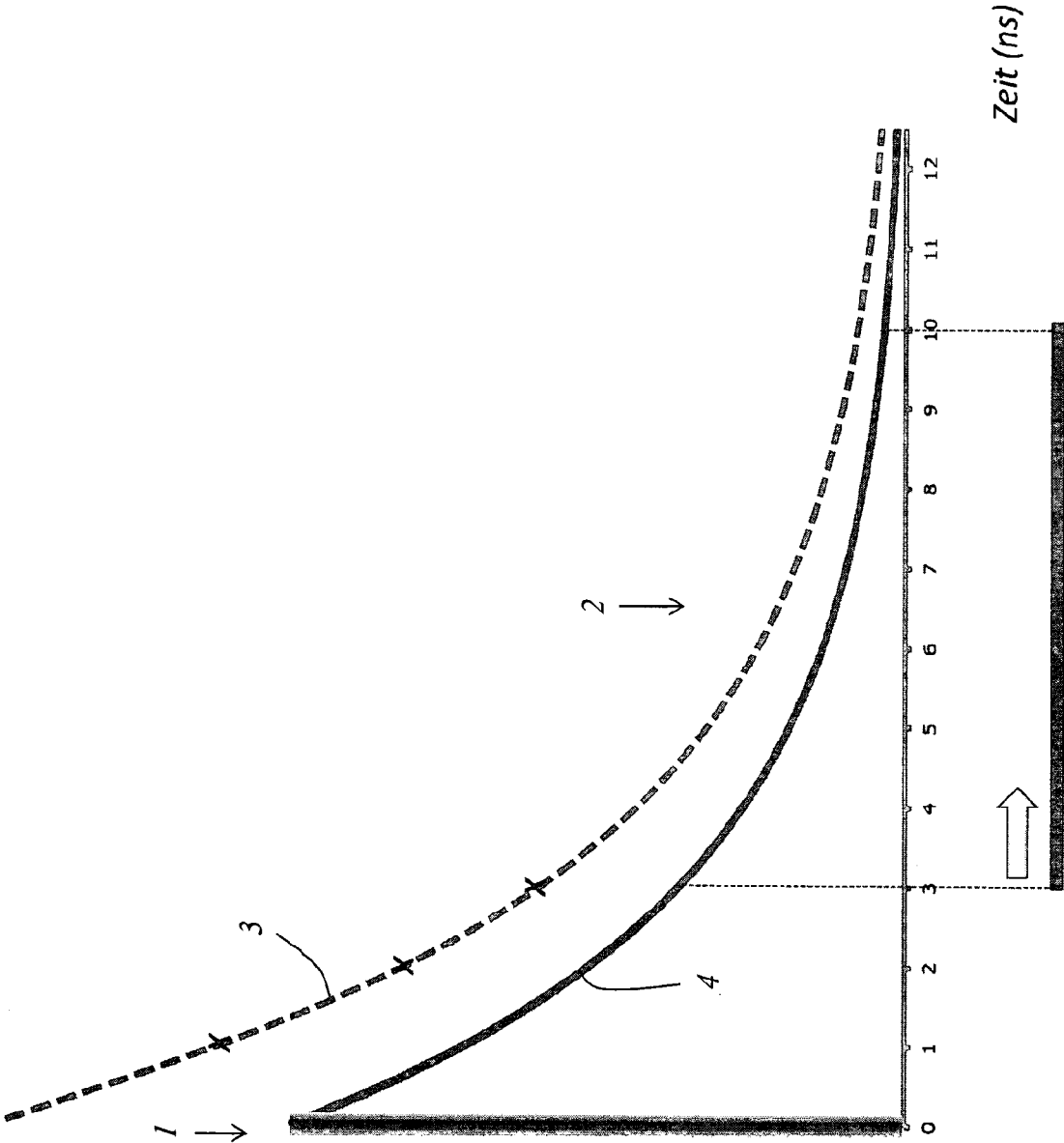


Fig. 4

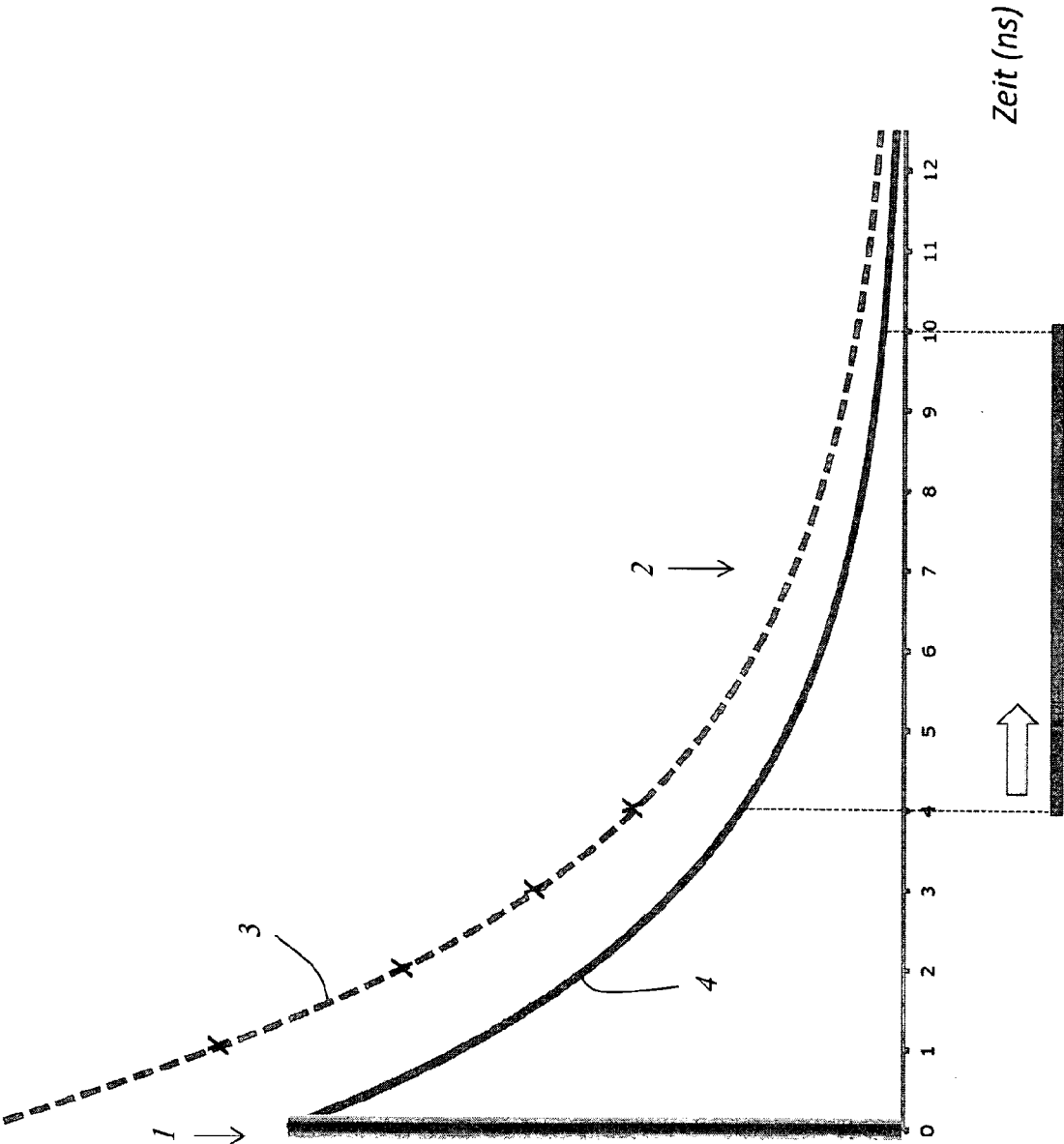


Fig. 5

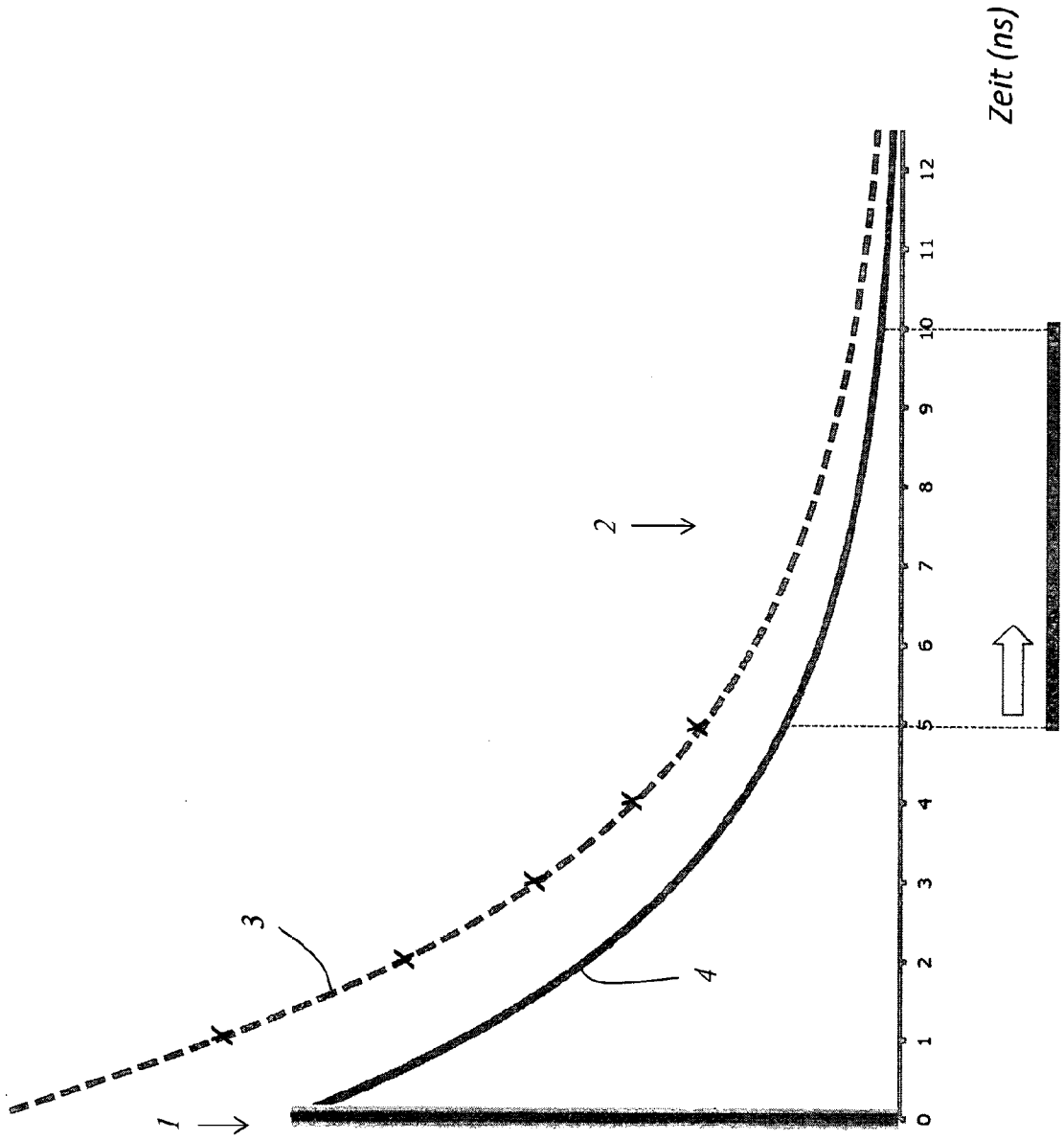


Fig. 6

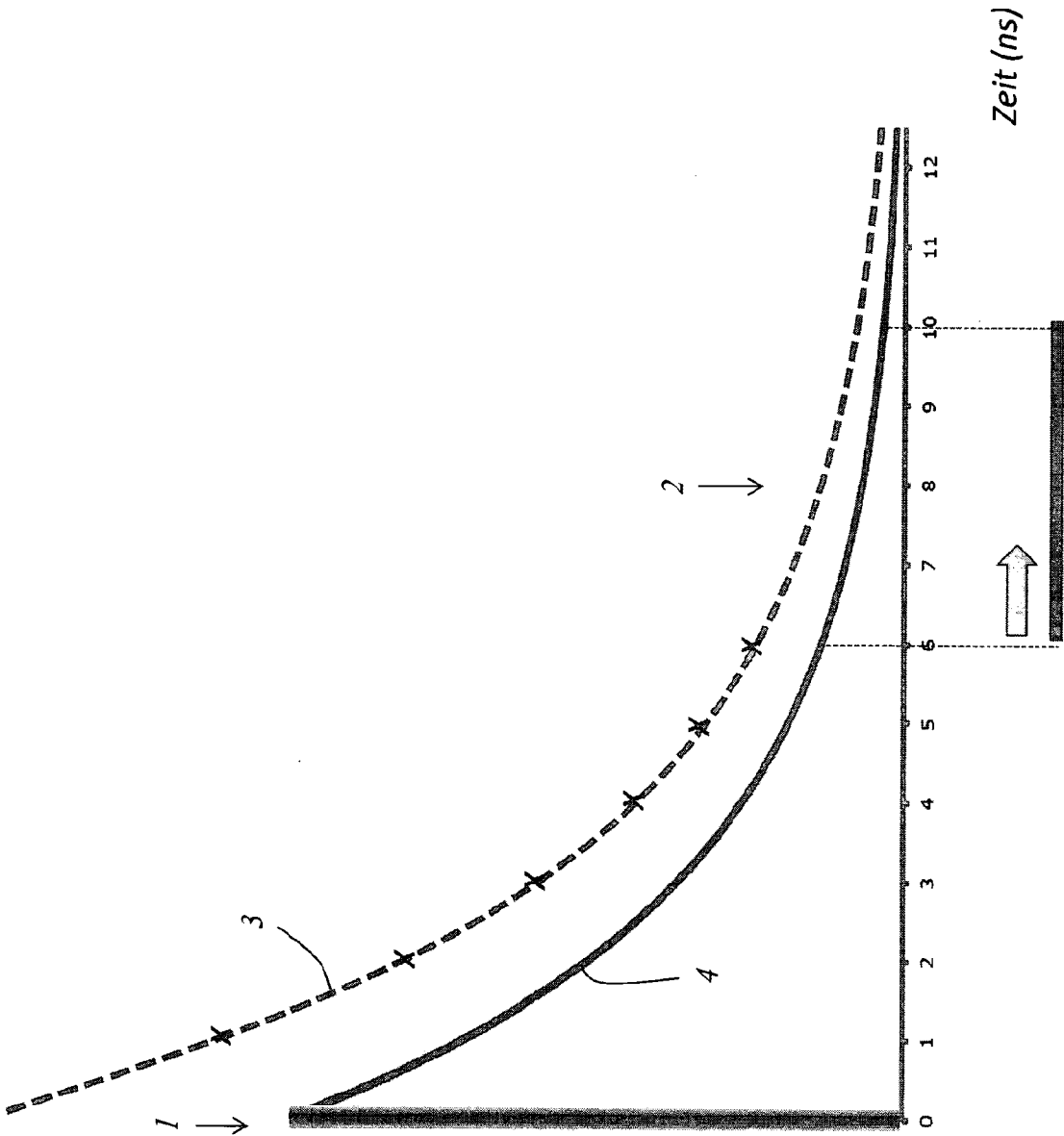


Fig. 7

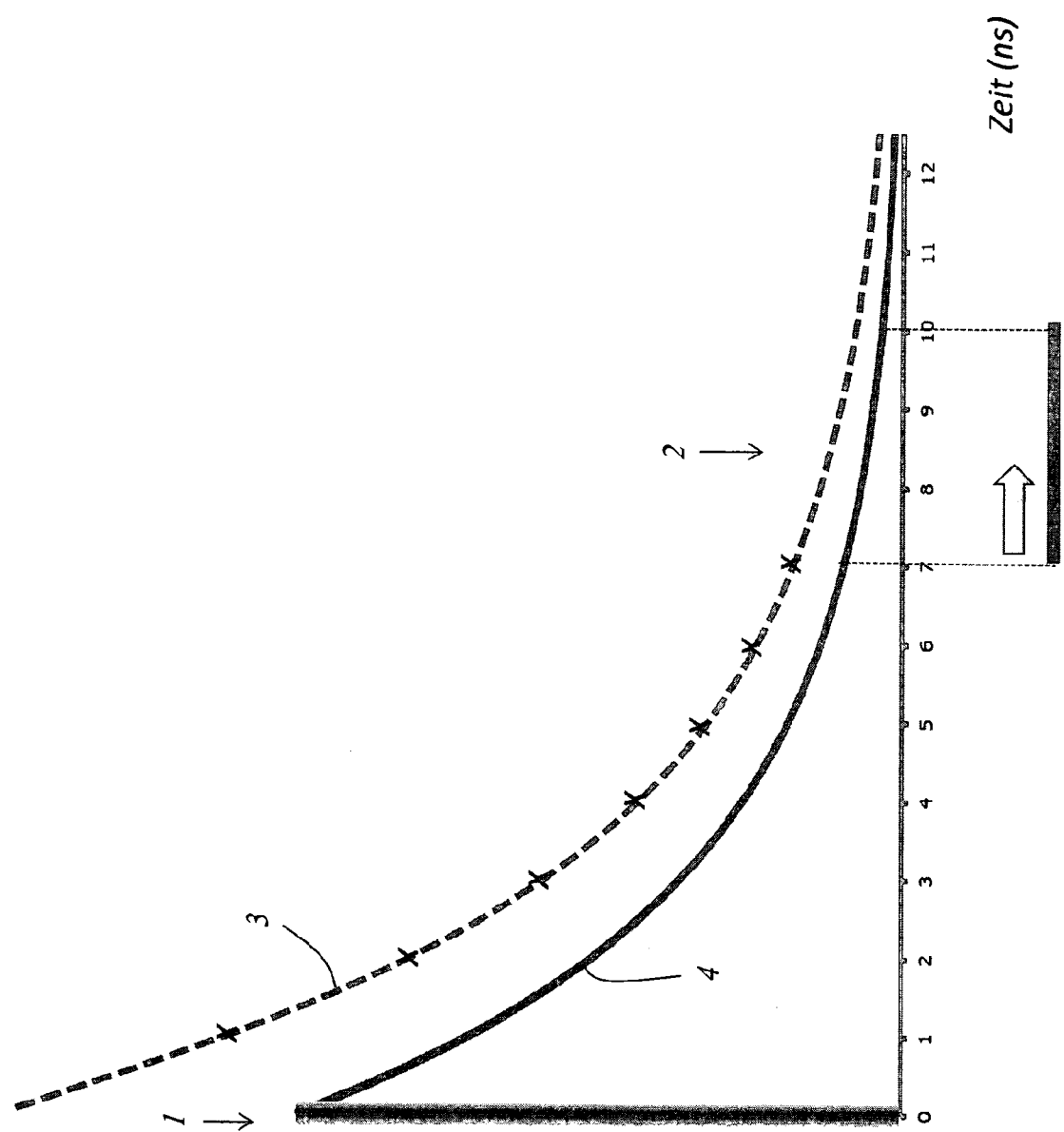


Fig. 8

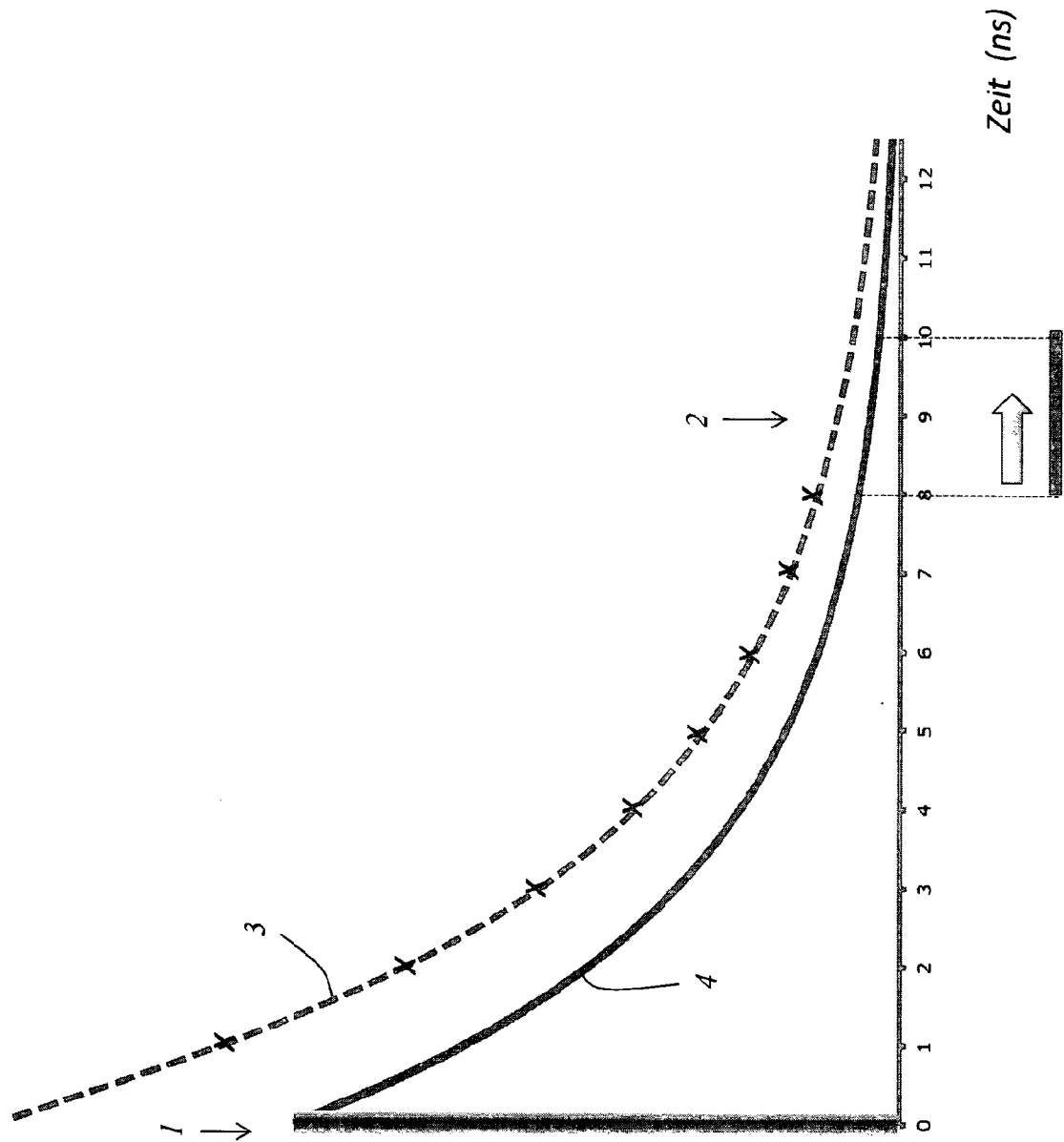


Fig. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/058195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N21/64

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DARI-SALISBURGO C ET AL: "Laser induced fluorescence instrument for NO2 measurements: Observations at a central Italy background site", ATMOSPHERIC ENVIRONMENT, PERGAMON, GB, vol. 43, no. 4, 2009, pages 970-977, XP025963016, ISSN: 1352-2310, DOI: 10.1016/J.ATMOENV.2008.10.037 [retrieved on 2008-10-26]	1,3,5,9, 11, 14-16, 21,23
Y	page 971 - page 973 -----	10,22
X	WO 2011/090745 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP [US]; BEECHEM JOSEPH [US]; KOTSEROGLU THEOFILO) 28 July 2011 (2011-07-28)	1,3,5,9, 11, 13-15, 23,24
Y	paragraphs [0039] - [0050]; figure 1 ----- -/--	10,22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 2013

Date of mailing of the international search report

08/07/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoogen, Ricarda

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/058195

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/18529 A1 (VARIAN AUSTRALIA [AU]; MCCALLUM VANESSA MARY JOY [AU]; KASELIS MARTIN) 15 March 2001 (2001-03-15)	1,11,14, 15,23
Y	page 16, line 29 - page 18, line 5; figure 8	10,22
X	----- EP 0 626 575 A1 (WALLAC OY [FI]) 30 November 1994 (1994-11-30)	1,2,11, 13-15, 23,24
Y	page 7, lines 56-58; figure 17	10,22
X	----- SCHWARTZ D E ET AL: "A Single-Photon Avalanche Diode Array for Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy", IEEE JOURNAL OF SOLID-STATE CIRCUITS, IEEE SERVICE CENTER, PISCATAWAY, NJ, USA, vol. 43, no. 11, November 2008 (2008-11), pages 2546-2557, XP011238692, ISSN: 0018-9200, DOI: 10.1109/JSSC.2008.2005818	1,3,11, 13-15, 23,24
Y	page 2546 - page 2547	10,22
X	----- H. C. GERRITSEN ET AL: "Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: acquisition speed, photon economy and lifetime resolution", JOURNAL OF MICROSCOPY, vol. 206, no. 3, 14 June 2002 (2002-06-14) , pages 218-224, XP055068851, ISSN: 0022-2720, DOI: 10.1046/j.1365-2818.2002.01031.x	1,2,6,8, 11-15, 18,20, 23,24
Y	page 219 - page 220	10,22
Y	----- US 2006/187448 A1 (YE JING Y [US] ET AL YE JING YONG [US] ET AL) 24 August 2006 (2006-08-24) paragraphs [0023], [0026]	10,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/058195

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011090745 A1	28-07-2011	US 2011236983 A1 WO 2011090745 A1	29-09-2011 28-07-2011
WO 0118529 A1	15-03-2001	EP 1127264 A1 JP 2003508784 A US 6657720 B1 WO 0118529 A1	29-08-2001 04-03-2003 02-12-2003 15-03-2001
EP 0626575 A1	30-11-1994	DE 69429553 D1 DE 69429553 T2 EP 0626575 A1 FI 932436 A	07-02-2002 12-09-2002 30-11-1994 10-01-1995
US 2006187448 A1	24-08-2006	US 2006187448 A1 WO 2006089093 A2	24-08-2006 24-08-2006

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/058195

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N21/64
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DARI-SALISBURGO C ET AL: "Laser induced fluorescence instrument for NO2 measurements: Observations at a central Italy background site", ATMOSPHERIC ENVIRONMENT, PERGAMON, GB, Bd. 43, Nr. 4, 2009, Seiten 970-977, XP025963016, ISSN: 1352-2310, DOI: 10.1016/J.ATMOENV.2008.10.037 [gefunden am 2008-10-26]	1,3,5,9, 11, 14-16, 21,23
Y	Seite 971 - Seite 973 -----	10,22
X	WO 2011/090745 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP [US]; BEECHEM JOSEPH [US]; KOTSEROGLOU THEOFILO) 28. Juli 2011 (2011-07-28)	1,3,5,9, 11, 13-15, 23,24
Y	Absätze [0039] - [0050]; Abbildung 1 ----- -/-	10,22

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. Juli 2013	08/07/2013
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Hoogen, Ricarda

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/18529 A1 (VARIAN AUSTRALIA [AU]; MCCALLUM VANESSA MARY JOY [AU]; KASELIS MARTIN) 15. März 2001 (2001-03-15)	1,11,14, 15,23
Y	Seite 16, Zeile 29 - Seite 18, Zeile 5; Abbildung 8	10,22

X	EP 0 626 575 A1 (WALLAC OY [FI]) 30. November 1994 (1994-11-30)	1,2,11, 13-15, 23,24
Y	Seite 7, Zeilen 56-58; Abbildung 17	10,22

X	SCHWARTZ D E ET AL: "A Single-Photon Avalanche Diode Array for Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy", IEEE JOURNAL OF SOLID-STATE CIRCUITS, IEEE SERVICE CENTER, PISCATAWAY, NJ, USA, Bd. 43, Nr. 11, November 2008 (2008-11), Seiten 2546-2557, XP011238692, ISSN: 0018-9200, DOI: 10.1109/JSSC.2008.2005818	1,3,11, 13-15, 23,24
Y	Seite 2546 - Seite 2547	10,22

X	H. C. GERRITSEN ET AL: "Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: acquisition speed, photon economy and lifetime resolution", JOURNAL OF MICROSCOPY, Bd. 206, Nr. 3, 14. Juni 2002 (2002-06-14), Seiten 218-224, XP055068851, ISSN: 0022-2720, DOI: 10.1046/j.1365-2818.2002.01031.x	1,2,6,8, 11-15, 18,20, 23,24
Y	Seite 219 - Seite 220	10,22

Y	US 2006/187448 A1 (YE JING Y [US] ET AL YE JING YONG [US] ET AL) 24. August 2006 (2006-08-24) Absätze [0023], [0026]	10,22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/058195

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung	
WO 2011090745	A1	28-07-2011	US	2011236983	A1			29-09-2011	
			WO	2011090745	A1			28-07-2011	

WO 0118529	A1	15-03-2001	EP	1127264	A1			29-08-2001	
			JP	2003508784	A			04-03-2003	
			US	6657720	B1			02-12-2003	
			WO	0118529	A1			15-03-2001	

EP 0626575	A1	30-11-1994	DE	69429553	D1			07-02-2002	
			DE	69429553	T2			12-09-2002	
			EP	0626575	A1			30-11-1994	
			FI	932436	A			10-01-1995	

US 2006187448	A1	24-08-2006	US	2006187448	A1			24-08-2006	
			WO	2006089093	A2			24-08-2006	
