

(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
06. Februar 2020 (06.02.2020)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2020/025679 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/33 (2006.01) *G02B 21/34* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/070640
- (22) Internationales Anmeldedatum:
31. Juli 2019 (31.07.2019)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2018 118 484.0
31. Juli 2018 (31.07.2018) DE
- (71) Anmelder: **INSTITUT FÜR BIOPROZESS- UND ANALYSENMESSTECHNIK E. V.** [DE/DE]; Rosenhof 1, 37308 Heilbad Heiligenstadt (DE).
- (72) Erfinder: **LEMKE, Karen**; Düstere Eichen Weg 37a, 37073 Göttingen (DE). **RÖMER, Robert**; Albert-Schweitzer-Str. 8, 37308 Heilbad Heiligenstadt (DE). **GRO-**

DRIAN, Andreas; Auf der Rinne 24, 37308 Heilbad Heiligenstadt (DE). **WIEDEMEIER, Stefan**; Petershütter Allee 7, 37520 Osterode (DE). **ECHTERMEYER, Danny**; Hauptstrasse 17, 99752 Lipprechterode (DE). **GASTROCK, Gunter**; Ibergstrasse 4, 37308 Heilbad Heiligenstadt (DE).

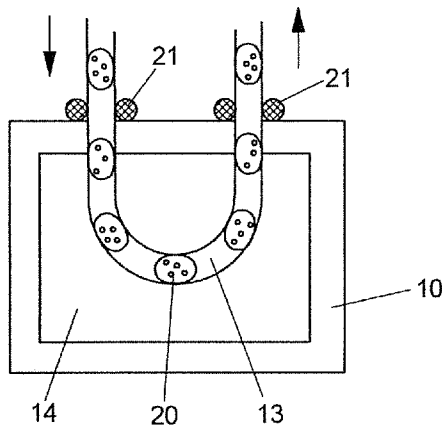
(74) **Anwalt: MAIKOWSKI & NINNEMANN, PATENTANWÄLTE, PARTNERSCHAFT MBB**; Postfach 15 09 20, 10671 Berlin (DE).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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,

(54) **Title:** DEVICE AND METHODS FOR OPTICALLY CHARACTERIZING FLUIDS AND/OR OBJECTS ENCLOSED THEREIN IN MICROCHANNELS

(54) **Bezeichnung:** VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR OPTISCHEN CHARAKTERISIERUNG VON FLUIDEN UND/ODER DARIN EINGESCHLOSSENER OBJEKTE IN MIKROKANÄLEN

FIG 5A



(57) **Abstract:** The invention relates to a device (200) for optically characterizing fluids and/or objects enclosed therein in a microchannel (13), comprising a measurement cell (10, 120). The microchannel (13) is guided through the measurement cell (10, 120), wherein the measurement cell (10, 120) is filled with a liquid (14), the microchannel (13) is located within the measurement cell (10, 120) in the liquid (14), the fluid and/or objects enclosed therein can be moved in the microchannel (13), and the microchannel (13) can be moved manually or automatically within the measurement cell (10, 120) and/or the measurement cell (10, 120) can be moved manually or automatically together with the microchannel (13). The invention additionally relates to a measurement cell (10, 120) for the device (200) and to methods for optically characterizing fluids and/or objects enclosed therein in a microchannel (13) by means of the device (200).

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung (200) für die optische Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in einem Mikrokanal (13), umfassend eine Messzelle (10, 120), wobei der Mikrokanal (13) durch die Messzelle (10, 120) geführt wird, wobei die Messzelle (10, 120) mit einer Flüssigkeit (14) gefüllt ist, der Mikrokanal (13) sich innerhalb der Messzelle (10, 120) in der Flüssigkeit (14) befindet, das Fluid und/oder darin eingeschlossene Objekte in dem Mikrokanal (13) bewegbar sind und der Mikrokanal (13) innerhalb der Messzelle (10, 120) und/oder die Messzelle (10, 120) mit dem Mikrokanal (13) manuell oder automatisch bewegbar ist. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Messzelle (10, 120) für die Vorrichtung (200) und Verfahren für die optische Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in einem Mikrokanal (13) mittels der Vorrichtung (200).



WO 2020/025679 A1

SA, 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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

Vorrichtung und Verfahren zur optischen Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in Mikrokanälen

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für die optische Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in einem Mikrokanal, umfassend eine Messzelle, wobei der Mikrokanal durch die Messzelle geführt wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle mit einer Flüssigkeit gefüllt ist, der Mikrokanal sich innerhalb der Messzelle in der
10 Flüssigkeit befindet, das Fluid und/oder darin eingeschlossene Objekte in dem Mikrokanal bewegbar sind und der Mikrokanal innerhalb der Messzelle und/oder die Messzelle mit dem Mikrokanal manuell oder automatisch bewegbar ist. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Messzelle für die Vorrichtung und Verfahren für die optische Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in einem Mikrokanal mittels der erfindungsgemäßen
15 Vorrichtung.

Hintergrund der Erfindung

Geräte und Verfahren auf der Basis mikrofluidischer Prinzipien haben sich im Laborbereich umfassend etabliert. Die Vorteile sind unter anderem ein geringerer Verbrauch von Reagenzien
20 und Probenmaterialien pro Versuchsansatz bei gleichzeitiger Erhöhung der Zahl simultan durchführbarer Versuchsansätze. Ein Beispiel dafür sind Wells von Mikrotiterplatten, in denen pro Platte bis zu 1536 parallele Messungen möglich sind. Neben den etablierten plattenbasierten Verfahren setzen sich zunehmend sogenannte „tropfenbasierte“ mikrofluidische Verfahren u.a. für biologische und biomedizinische Applikationen durch.

25 Bereits bekannt sind sogenannte „*pipe based bioreactors*“ (*pbb*), wie beispielsweise von der Anmelderin entwickelt. Dabei handelt es sich um ein modular aufgebautes Zellkultivierungssystem, das auf dem Prinzip der tropfenbasierten bzw. kompartimentbasierten Mikrofluidik beruht und für mittlere bis hohe Durchsätze ausgelegt ist. In einem Mikrokanal,
30 hier gebildet durch einen Schlauch, befinden sich seriell angeordnete Tropfen (Kompartimente), die aus biologischen Medien mit darin befindlichen Zellen bestehen. Jeder Tropfen kann dabei als „Mikrobioreaktor“ betrachtet werden. Die im Allgemeinen wässrigen Tropfen sind separiert mit einem mit Wasser nicht mischbarem Fluid, beispielsweise einem Öl. Der Schlauch besteht aus Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Fluorethylenpropylen (FEP) und

hat eine Länge von mehreren Metern, ist auf einer Disk aufgewickelt und fasst eine Vielzahl von Tropfen. Die Schlauchdisk mit den darin befindlichen Tropfen kann bis zu mehreren Wochen im Inkubator kultiviert werden, wobei in bestimmten Abständen eine Detektion der in den Tropfen befindlichen Zellen erfolgen soll. Dazu wird im einfachsten Fall die Schlauchdisk

5 aus dem Inkubator entnommen und mikroskopiert. Allerdings ist die optische Auflösung aufgrund der ungünstigen optischen und geometrischen Eigenschaften insbesondere des PTFE-Schlauches und der unterschiedlichen Brechungsindizes n beim Übergang von Luft ($n = 1$) in den PTFE-Schlauch ($n = 1,38$) begrenzt und in den Tropfen enthaltene biologische Objekte können bei 600-facher Vergrößerung oder mehr nicht mehr sinnvoll abgebildet werden. Da in

10 den Tropfen teilweise 3D Zellstrukturen (Sphäroide oder auch Gewebefragmente wie Biopsien) kultiviert werden, müssen die Tropfen ihre Form beibehalten. Ein Verjüngen oder Strecken der Tropfen zum besseren Mikroskopieren ist deshalb und auch aus physikalischen Gründen (Änderung des Laplace-Drucks) nicht möglich und würde zum Zerstören der Tropfen und der darin befindlichen Zellstrukturen führen. Eine Alternative wäre das Überführen der Tropfen

15 aus dem PTFE-Schlauch in eine Glaskapillare gleichen Durchmessers. Da Glas hydrophile Oberflächeneigenschaften besitzt, muss jedoch eine hydrophobe Beschichtung der Glasinnenwand erfolgen, beispielsweise mit einem Plasmaverfahren. Die Standzeit solcher Plasmaschichten erwies sich allerdings als zu gering und nach kurzer Zeit erfolgte eine Adhäsion von Tropfen an der Glasinnenwand und damit die Zerstörung der Tropfensequenz.

20 Problematisch sind zudem Kupplungen zwischen Schlauch und Glaskapillare, die aufgrund der geometrischen Übergänge ebenfalls die Adhäsion von Tropfen initiieren können. Eine Überführung in Polymerchips zum Mikroskopieren stellt eine weitere Alternative dar, wobei die Standzeit der Plasmabeschichtung auf Polymeroberflächen größer ist als auf Glas. Polymerchips sind im Allgemeinen für die Durchlicht- und die Epifluoreszenzmikroskopie

25 geeignet, nicht jedoch für spezielle Verfahren wie die Lichtblattmikroskopie, bei der das Anregungslicht (Laserlichtblatt) senkrecht zur Richtung des Detektionsobjektivs eingekoppelt wird. Zudem ist der Brechungsindex von Polymeren ($n = 1,585$ für Polycarbonat (PC), siehe Tabelle 1) ungünstig und ein optischer Ausgleich wäre aufgrund des zwingend notwendigen kreisförmigen Querschnitts des Mikrokanals im Polymerchip nur mit hohem Aufwand möglich.

30

Tabelle 1: Brechungsindizes n relevanter Materialien.

Wasser	$n = 1,33$
Polycarbonat (PC)	$n = 1,585$

Glas (Deckgläser für Mikroskopie)	n = 1,5255
Perfluordecalin (PFD)	n = 1,3145
Polytetrafluorethylen (PTFE)	n = 1,38
Fluorethylenpropylen (FEP)	n = 1,344

Eine weitere Herausforderung ist das exakte Positionieren der im Schlauch befindlichen Tropfen im Strahlengang der optischen Abbildung eines Mikroskops. Der Transport der Tropfen im Schlauch erfolgt im Allgemeinen mittels Spritzenpumpen oder druckgetriebenen Pumpen. Spritzenpumpen müssen zum Bewegen der Kompartimente einen Mindestdruck aufbauen, der abhängig vom Gegendruck im Schlauch ist, der wiederum von dessen Länge und der Anzahl der im Schlauch befindlichen Tropfen abhängt. Wird dieser Mindestdruck erreicht, beginnen sich die Tropfen zu bewegen und es stellt sich ein konstanter Druckwert ein. Ein exaktes Stoppen der sich bewegenden Tropfen zum Zweck des Positionierens eines Tropfens im Strahlengang der optischen Abbildung ist aufgrund einer Druckhysterese nicht möglich, d.h., es wird ein Nachlaufen der Tropfensequenz erfolgen, bis sich wieder konstante Druckverhältnisse im Schlauch eingestellt haben. Die Verwendung von Spritzenpumpen für das exakte Positionieren der Tropfen scheidet daher aus.

Eine alternative Möglichkeit zum Transportieren von Flüssigkeiten in Mikrokanälen ist die Anwendung von Schlauch- bzw. Rollenpumpen. Diese können jedoch sehr oft den in den Mikrokanälen vorherrschenden, u.a. von Länge und Durchmesser der Mikrokanäle abhängigen Druck nicht überwinden und sind aus diesem Grund nicht geeignet. Ein weiterer Nachteil ist Ungleichmäßigkeit des Flüssigkeitsstromes, hervorgerufen durch die Rollen der Schlauch- bzw. Rollenpumpen.

Für die Bewegung der Tropfensequenz mittels druckgetriebener Pumpen ist charakteristisch, dass sie durch ihr schnelles Start/Stop-Verhalten die Tropfen exakt im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung positionieren können. Nachteilig ist, dass die druckgetriebenen Pumpen den Druck im System und damit auch im Schlauch permanent regeln müssen, was sich in einer periodischen Bewegung (Schwingung) der Tropfen äußert. Diese Schwingung ist zwar gering, verhindert aber eine exakte optische Abbildung des Tropfens und der darin befindlichen Zellen bzw. 3D-Zellstrukturen.

Die Verbindung der Lichtblattmikroskopie mit der Durchflusszytometrie ist dem Fachmann bekannt und wird in der US2014353522 diskutiert. Deschout, H. *et al.* (2014) beschreiben Untersuchungen von biologischen Proben in Mikrokanälen von Chip-Systemen mittels Lichtblattmikroskopie. Paiè, P. *et al.* (2016) beschreiben die Untersuchung von Gewebeproben mittels Mikrofluidstrukturen in einem seriellen Hochdurchsatzverfahren. Die zuvor genannten Probleme der exakten Probenpositionierung im Strahlengang der optischen Abbildung eines Mikroskops und die mangelnde Qualität der erzeugbaren Abbildungen bei Vergrößerungen von mehr als 600fach konnten bislang jedoch nicht gelöst werden.

10 **Beschreibung der Erfindung**

Die Aufgabe der Erfindung besteht deshalb darin, die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden und Vorrichtungen und Verfahren zu entwickeln, die eine verbesserte optische Detektion (Mikroskopie, Spektroskopie) der sich in einem Mikrokanal befindlichen Proben ermöglichen.

15

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Vorrichtung nach Anspruch 1, eine Messzelle nach Anspruch 8 sowie ein Verfahren nach Anspruch 11.

20

Die Erfindung stellt insbesondere eine Vorrichtung für die optische Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in einem Mikrokanal bereit, umfassend eine Messzelle, wobei durch die Messzelle ein Mikrokanal geführt wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle mit einer Flüssigkeit gefüllt ist, der Mikrokanal sich innerhalb der Messzelle in der Flüssigkeit befindet, das Fluid im Mikrokanal und/oder darin eingeschlossene Objekte in dem Mikrokanal bewegbar sind, und der Mikrokanal innerhalb der Messzelle und/oder die Messzelle mit dem Mikrokanal manuell oder automatisch bewegbar ist.

25

Die Flüssigkeit, mit der die Messzelle gefüllt ist, ist ausgewählt aus einer wässrigen oder einer nicht wässrigen Flüssigkeit. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Flüssigkeit, mit der die Messzelle gefüllt ist, eine wässrige Flüssigkeit, besonders bevorzugt Wasser, beispielsweise Leitungswasser, destilliertes Wasser oder deionisiertes Wasser, oder Wasser mit spezifischen Eigenschaften wie Puffer oder Zellkulturnährmedium.

30

In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung ist die Flüssigkeit, mit der die Messzelle gefüllt ist, eine nichtwässrige Flüssigkeit, vorzugsweise ein Öl. Besonders bevorzugt ist es, wenn die Messzelle mit Perfluordecalin (PFD) gefüllt ist.

5 Besonders gute Ergebnisse in Bezug auf die Qualität der Abbildungen, die von dem Fluid und/oder darin enthaltenen Proben in dem Mikrokanal mit einem Mikroskop erhalten werden können, werden erzielt, wenn die Brechungsindizes der Flüssigkeit, mit der die Messzelle gefüllt ist und des Fluids, das sich in dem Mikrokanal befindet und des Materials, aus dem die
10 Wandung des Mikrokanals besteht, ähnlich, d.h. vergleichbar sind. Vorzugsweise weisen die Flüssigkeit, mit der die Messzelle gefüllt ist und das Fluid, das sich in dem Mikrokanal befindet und das Material, aus dem die Wandung des Mikrokanals besteht, Brechungsindizes von kleiner als $n = 1,5$, vorzugsweise von kleiner als $n = 1,4$, besonders bevorzugt im Bereich von $n = 1,30$ bis $1,39$, beispielsweise zwischen $n = 1,31$ und $1,38$ auf.

15 Der Mikrokanal ist vorzugsweise ein Schlauch, der aus PTFE oder FEP besteht, da diese Materialien einen Brechungsindex ähnlich zu dem Brechungsindex von Wasser aufweisen (siehe Tabelle 1) und hydrophobe Oberflächeneigenschaften besitzen. Besonders bevorzugt ist es, wenn der Schlauch aus FEP besteht, da FEP im Vergleich zu PTFE bessere optische Eigenschaften, eine bessere Transparenz und eine bessere Oberflächentopografie aufweist.

20 Der Mikrokanal der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist einen Innendurchmesser zwischen $50 \mu\text{m}$ und $2400 \mu\text{m}$, vorzugsweise zwischen $100 \mu\text{m}$ und $1800 \mu\text{m}$, besonders bevorzugt zwischen $250 \mu\text{m}$ und $1200 \mu\text{m}$, insbesondere bevorzugt zwischen $500 \mu\text{m}$ und $1000 \mu\text{m}$ auf.

25 Das Fluid, das sich in dem Mikrokanal befindet, ist eine Flüssigkeit und vorzugsweise zweiphasig und besteht aus seriell angeordneten Tropfen, die aus biologischen Medien mit darin befindlichen Zellen, Gewebefragmenten oder 3D-Zellstrukturen, wie Sphäroiden, bestehen. Jeder Tropfen kann dabei als „Mikrobioreaktor“ betrachtet werden. Die wässrigen Tropfen sind separiert mit einer mit Wasser nicht mischbaren Flüssigkeit, beispielsweise einem
30 Öl. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem in dem Mikrokanal befindlichen Fluid um eine einphasige Flüssigkeit, wie beispielsweise ein Nährmedium, eine Pufferlösung, Saline oder ähnliches, mit darin befindlichen Zellen, Gewebefragmenten oder 3D-Zellstrukturen, wobei keine Tropfenseparierung durch ein Öl oder ähnliches erfolgt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem in dem Mikrokanal befindlichen Fluid um eine mehrphasige Flüssigkeit, umfassend seriell angeordnete Tropfen in einem Öl oder einer organischen Flüssigkeit, die aus biologischen Medien mit darin
5 befindlichen Zellen, Gewebefragmenten oder 3D-Zellstrukturen, wie Sphäroiden, bestehen. Jeder Tropfen kann dabei als „Mikrobioreaktor“ betrachtet werden. Die wässrigen Tropfen sind separiert mit einer mit Wasser nicht mischbaren Flüssigkeit, beispielsweise einem Öl oder einer organischen Flüssigkeit. Innerhalb der wässrigen Tropfen kann sich mindestens eine weitere nicht-wässrige Phase befinden, wie beispielsweise mindestens ein Öltropfen und/oder
10 mindestens ein Gasbläschen und/oder mindestens ein Kompartiment aus einer organischen Flüssigkeit und/oder mindestens ein gelartiges Kompartiment. Eine Gasblase kann auch zwischen zwei wässrigen Tropfen positioniert werden, um beispielsweise als zusätzliche Gasversorgung zu dienen.

15 Der Mikrokanal wird erfindungsgemäß durch eine mit einer Flüssigkeit gefüllte Messzelle geführt. Dies hat den Vorteil, dass die Flüssigkeit, mit der die Messzelle gefüllt ist, so ausgewählt werden kann, dass deren Brechungsindex mit dem Brechungsindex der Wandung des Mikrokanals und des sich in dem Mikrokanal befindlichen Fluids vergleichbar ist, was zur Verbesserung der Qualität der Abbildungen der Proben in dem Mikrokanal mit einem
20 Mikroskop führt. Zudem ist die Flüssigkeit, mit der die Messzelle gefüllt ist, konditionierbar, sodass eine Diffusion von O₂ und/oder CO₂ über die Wandung des Mikrokanals erfolgt und somit eine Versorgung von biologischen Objekten im Tropfen erfolgen kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Position des Mikrokanals durch
25 translatorische und/oder rotatorische Bewegungen verändert werden, wodurch auch die Position der Proben im Mikrokanal gegenüber dem Objektiv des Mikroskops bei gleichzeitiger Beibehaltung der Position der Messzelle gegenüber dem Objektiv definiert geändert werden kann. Die Bewegung des Mikrokanals kann manuell oder automatisiert erfolgen.

30 Alternativ ist es auch möglich, die Position der gesamten Messzelle, die den Mikrokanal enthält, zu verändern und dadurch die Position der Proben im Mikrokanal gegenüber dem Objektiv des Mikroskops definiert zu ändern.

Unter Proben werden im Sinne der Erfindung Tropfen, Kompartimente oder Segmente eines wässrigen Mediums in einem zweiphasigen oder mehrphasigen Fluid verstanden, wobei die Tropfen mit einem mit Wasser nicht mischbarem Fluid, beispielsweise einem öligen Fluid, separiert sind. Ein bevorzugtes öliges Fluid ist Perfluordecalin (PFD), da dieses Öl eine zu dem von Wasser vergleichbaren Brechungsindex aufweist. Die durch dieses ölige Fluid separierten Tropfen, Kompartimente oder Segmente enthalten die eigentlichen mikroskopischen Objekte wie Zellen, Gewebe oder Sphäroide. Wird in der erfindungsgemäßen Vorrichtung ein einphasiges Fluid verwendet, so werden unter Proben im Sinne der Erfindung die sich in dem einphasigen Fluid befindlichen mikroskopischen Objekte wie Zellen, Gewebe oder Sphäroide verstanden.

Die Messzelle der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform mit einer Flüssigkeit, wie beispielsweise Wasser oder einem Öl, gefüllt. Der Teil des Mikrokanals, der in den Strahlengang eines Mikroskops zur optischen Analyse der Proben eingebracht werden soll, befindet sich in der Flüssigkeit in der Messzelle. Dies hat den Vorteil, dass die Flüssigkeit die topografischen Unregelmäßigkeiten (Fertigungsspuren etc.) an der Außenfläche des Mikrokanals, wie beispielsweise eines Probenschlauches, ausfüllt und so einen ungestörten Lichtübergang garantiert. Die Anpassung der Brechungsindizes (Wasser – FEP (bzw. PTFE) – Wasser bzw. Öl) führt zu einer weiteren Verbesserung der optischen Abbildung (Brechungsindizes siehe Tabelle 1).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung weist die Vorrichtung am Eingang des Mikrokanals in die Messzelle oder am Eingang des Mikrokanals in die Messzelle und am Ausgang des Mikrokanals aus der Messzelle oder am Ausgang des Mikrokanals aus der Messzelle eine Pumpe auf. Enthält die Vorrichtung nur eine Pumpe am Eingang oder am Ausgang des Mikrokanals in bzw. aus der Messzelle, so ist diese Pumpe vorzugsweise als Schlauch- oder Rollenpumpe ausgeführt. Vorzugsweise weist die Vorrichtung eine Pumpe am Eingang des Mikrokanals in die Messzelle und am Ausgang des Mikrokanals aus der Messzelle auf. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind diese Pumpen als Druckpumpen ausgeführt, wobei die Pumpe am Ausgang des Mikrokanals aus der Messzelle mit Unterdruck arbeitet. Mit der Verwendung von Druckpumpen kann das eingangs geschilderte Problem des Nachlaufens der Tropfensequenz besonders effektiv vermieden werden. Vorzugsweise sind die Pumpen mit einem Mittel bzw. System zur Bestimmung der Probenposition gekoppelt. Das von diesem System ausgehende Signal schaltet die Pumpe(n) definiert ab und die Tropfensequenz

stoppt unmittelbar. Damit ist eine definierte Vorwahl der Probenposition im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung eines Mikroskops möglich.

Das bereits beschriebene Schwingen der Proben, wie beispielsweise der Tropfen in einem Mikrokanal, aufgrund der notwendigen Regelung der Pumpe(n), wird erfindungsgemäß eliminiert durch die fluidische Entkopplung der Pumpe(n) vom Mikrokanal, wie beispielsweise einem Probenschlauch, und damit von der Tropfensequenz während der optischen Detektion. Hierzu weist die erfindungsgemäße Vorrichtung gemäß einer weiteren Ausführungsform zwischen der Pumpe und der Messzelle am Eingang des Mikrokanals in die Messzelle ein Ventil (Absperrhahn) und/oder zwischen der Pumpe und der Messzelle am Ausgang des Mikrokanals aus der Messzelle ein weiteres Ventil (Absperrhahn) auf. Dabei ist es wichtig, dass die Absperrhähne keine Volumenverdrängung im Probenschlauch hervorrufen. Anderenfalls würden sich die Proben undefinierte, sprunghafte Bewegungen ausführen. Außerdem dürfen die Proben nicht durch die Betätigung der Absperrhähne transportiert werden, was zu undefinierten Adhäsionseffekten in den Absperrhähnen führen würde. Nach Abschluss der Probendetektion schalten die Absperrhähne wieder auf Durchgang, und die Pumpen fördern die nächste Probe der Probensequenz in den Bereich der optischen Abbildung des Mikroskops.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist die Messzelle ein geschlossenes Gehäuse auf und der Eingang des Mikrokanals in die Messzelle und der Ausgang des Mikrokanals aus der Messzelle weisen Mittel zur Abdichtung des Mikrokanals gegenüber dem Gehäuse der Messzelle auf, die die Bewegbarkeit des Mikrokanals innerhalb der Messzelle ermöglichen und gleichzeitig das Austreten der Flüssigkeit aus der Messzelle verhindern. Der Eingang des Mikrokanals in die Messzelle und der Ausgang des Mikrokanals aus der Messzelle sind an jeder Außenfläche der Messzelle anordenbar. In einer Ausführungsform der Erfindung ist der Eingang des Mikrokanals in die Messzelle an einer Außenfläche der Messzelle angeordnet und der Ausgang des Mikrokanals an der gegenüberliegenden Außenfläche der Messzelle. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind der Eingang des Mikrokanals in die Messzelle und der Ausgang des Mikrokanals aus der Messzelle an der gleichen Außenfläche angeordnet.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist die Messzelle ein an einer Seite offenes Gehäuse auf, durch die der Mikrokanal in die Messzelle hinein- und aus der Messzelle herausragt, wobei ein Teil des in die Messzelle hineinragenden Mikrokanals und ein Teil des aus der Messzelle herausragenden Mikrokanals mittels eines in alle

Raumrichtungen bewegbaren und mit der Messzelle nicht in Verbindung stehenden Mittels fest verbunden ist.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist die Messzelle
5 Durchführungen zum Befüllen der Messzelle mit einer Flüssigkeit, zum Entlüften der Messzelle, zum Durchführen von Lichtquellen und Sensoren, beispielsweise von Lichtleitern zur Einkopplung von Licht in die Messzelle oder von Lichtschranken oder Elektroden zur Positionsbestimmung von Proben im Mikrokanal oder zum Durchführen von Objektiven zum Emittieren und Detektieren von elektromagnetischer Strahlung auf.

10

Durch den Anschluss von Lichtleitern, die Licht in die Proben im Mikrokanal einkoppeln können, wird ermöglicht, dass eine einseitige oder beidseitige Anregung der Proben (Zellen) in den Tropfen eines Probenschlauches über Lichtleiter, beispielsweise für die Fluoreszenzmikroskopie erfolgen kann. Spektroskopische (Turbidimetrie, Nephelometrie u.a.)
15 Messungen und Kombinationen aus unterschiedlichen optischen Detektionsmethoden sind damit in vorteilhafter Weise realisierbar. Es ist möglich, mehrere parallel angeordnete optische und fluidische Ein/Ausgänge an der Messzelle zu realisieren.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist die
20 Messzelle einen Rahmen mit Dichtungen für den Mikrokanal und zwei mit dem Rahmen flüssigkeitsdicht (z.B. Dichtungen, Klebeverbindungen) verbundene Platten aus durchsichtigem Material, vorzugsweise einem Kunststoff oder Glas, besonders bevorzugt aus Glas, für den optischen Strahlengang des Mikroskopobjektivs auf. Die Messzelle weist einen durchgeführten Mikrokanal, wie beispielsweise einen Probenschlauch, auf, der über einen
25 Eingang in die Messzelle eingeführt wird und über einen Ausgang aus der Messzelle herausgeführt wird. Weitere Anschlüsse der Messzelle dienen dem Befüllen der Kammer mit der wässrigen Flüssigkeit sowie dem Entlüften der Kammer. Der Mikrokanal, wie beispielsweise ein Probenschlauch, kann durch den Eingang und den Ausgang durch die Kammer hindurch vor- oder zurückgezogen werden und/oder um die Achse des
30 Probenschlauches gedreht werden. Dadurch ist es möglich, die im Probenschlauch befindlichen Proben, z.B. Kompartimente, Tropfen, exakt im Bereich des Strahlenganges des Mikroskopobjektivs zu positionieren. Diese Möglichkeit des Ziehens und Drehens des Probenschlauches ist für den Fall der Verwendung von Spritzenpumpen zum Proben transport essenziell, da mit Spritzenpumpen ein exaktes Positionieren der Tropfen nicht möglich ist. Im

Fall der Verwendung von druckbasierten Pumpsystemen ist ein exaktes Positionieren der Probe auch ohne die Relativbewegung des Schlauches möglich. Die beiden Platten zur Abdichtung der Messzelle können beispielsweise Deckgläser sein.

5 In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist die Messzelle Anschlüsse auf, die mit einem Konditionierungsmodul verbunden sind, wobei eine Pumpe konditionierte Flüssigkeit aus dem Konditionierungsmodul durch die Messzelle und zurück zum Konditionierungsmodul fördert. Die Konditionierung der Flüssigkeit, die dann in die Messzelle eingebracht wird und den Mikrokanal umgibt, kann beispielsweise folgende
10 Parameter umfassen: Wassertemperatur T, O₂- und CO₂-Konzentration. Ein Gasaustausch ist beispielsweise über einen PTFE-Schlauch in bestimmten Grenzen möglich. Dadurch wird die Konditionierung des O₂- und des pH-Wertes des Fluids in dem Mikrokanal, insbesondere im Tropfen, ermöglicht. Die Möglichkeit zur Konditionierung erlaubt damit auch länger andauernde Untersuchungen in der Messzelle.

15 Die Messzelle der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht aus optisch transparenten Materialien oder optisch nicht transparenten Materialien oder aus einer Kombination oder einem Verbund optisch transparenter und nicht transparenter Materialien, wie beispielsweise aus Glas, geeigneten Kunststoffen, Metall oder Kombinationen oder Verbunden davon.

20 In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Messzelle eine Glasküvette. Diese weist einen Deckel und einen Boden auf, in denen der Mikrokanal abgedichtet und dreh- und verschiebbar geführt ist. Die Glasküvette ist mit einer wässrigen Flüssigkeit gefüllt. Die Beleuchtung kann wiederum beidseitig erfolgen.

25 In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Messzelle eine Messzelle für Tauchobjektive, die wiederum mit einer wässrigen Flüssigkeit gefüllt ist und Tauchobjektive verwendet. Die Mikrokanaldurchführung und Mikrokanalbewegung erfolgt analog zu den bisher vorgestellten Ausführungsformen der Messzellen.

30 In einer Ausführungsform kann die Messzelle geschlossen sein. Die Durchführungen für den Mikrokanal sind dann mit Dichtungen versehen. In Abhängigkeit des verwendeten Mikroskops kann es konstruktiv bevorzugt sein, dass die Einleitung und die Ausleitung des Mikrokanals an einer Fläche der Messzelle, vorzugsweise an einer Seite, wie beispielsweise an deren Deckel

erfolgen. Der Mikrokanal, beispielweise ein Probenschlauch, kann an einem Ende gezogen und in gleicher Weise gleichzeitig am anderen Ende geschoben werden oder nur an einem Ende gezogen oder nur an einem Ende geschoben werden oder an beiden Enden gleichzeitig gezogen oder geschoben werden, um die im Probenschlauch befindlichen Proben, z.B. Kompartimente, Tropfen, exakt im Bereich des Strahlenganges des Mikroskopobjektivs zu positionieren.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Messzelle nach oben hin offen, aber ebenfalls mit einer Flüssigkeit befüllt. In diesem Fall erfolgt die Fixierung des Mikrokanals, wie beispielsweise eines Probenschlauches, nicht an der Messzelle, sondern unabhängig von der Messzelle. Der so fixierte Probenschlauch kann als Ganzes in alle Raumrichtungen bewegt und in gewissen Grenzen auch gedreht werden, um die im Probenschlauch befindlichen Proben, z.B. Kompartimente oder Tropfen, exakt im Bereich des Strahlenganges des Mikroskopobjektivs zu positionieren.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist die Messzelle zusätzlich ein Zudosiermodul auf. Das Zudosiermodul weist ein Mikroventil zur definierten und zielgenauen Zugabe von Wirkstoffen zu den Proben im Mikrokanal sowie Mittel zur Positionierung der Proben in den Mikrokanal dem Strahlengang eines Mikroskops, wie Lichtschranken, Messelektroden, Sensoren oder eine Kamera auf. Damit können einerseits in vorteilhafter Weise die im Mikrokanal befindlichen Proben, z.B. Kompartimente oder Tropfen, exakt im Bereich des Strahlenganges des Mikroskopobjektivs positioniert werden. Andererseits ist es möglich, *in situ* Untersuchungen an den Proben durchzuführen, in dem Wirkstoffe, Testsubstanzen usw. direkt zu den im Mikrokanal befindlichen Proben zudosiert werden können. Aufgrund der Vielzahl der getrennten und seriell angeordneten Proben in einem zweiphasigen oder mehrphasigen Fluid in dem Mikrokanal ist es daher möglich, eine Vielzahl verschiedener Untersuchungen und Tests in kurzer Zeit durchzuführen bzw. die Wirkung einer Vielzahl von Testsubstanzen im Hochdurchsatz zu untersuchen.

Durch die an der Messzelle vorhandenen Anschlüsse ist es auch möglich, die in der Messzelle vorhandene Flüssigkeit auszutauschen und deren Zusammensetzung so anzupassen, dass die Flüssigkeit einen Brechungsindex aufweist, der mit der Wandung des Mikrokanals und dem sich in dem Mikrokanal befindlichen Fluid vergleichbar ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Vorrichtung deshalb ein Mittel zum Einstellen des Brechungsindex der Flüssigkeit in der Messzelle auf. Dabei handelt es sich beispielsweise

um ein System mit mindestens einem Vorratsbehälter für Flüssigkeiten und mindestens einer Pumpe sowie entsprechenden Schläuchen, mit deren Hilfen die Messzelle mit der gewünschten Flüssigkeit befüllbar ist.

5 Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist besonders geeignet für Verwendung am Aufrecht- bzw. Inversmikroskop. Es konnte gezeigt werden, dass die Qualität der optischen Abbildung von Zellen in Tropfen, die sich in einem PTFE-Schlauch befanden, der sich in einer mit Wasser befüllten Messzelle befand, erheblich gesteigert werden konnte gegenüber Abbildungen von Zellen in Tropfen, die sich in einem PTFE-Schlauch befanden, der sich nicht in einer mit
10 Wasser befüllten Messzelle befand. Durch die Verwendung von FEP-Schlauch mit im Vergleich zu PTFE-Schläuchen höheren Transparenz lässt sich die Qualität der optischen Abbildung noch weiter steigern. Ebenso ist mit einer Miniaturisierung der Messzelle und einer Verringerung der Wandstärke des Schlauches infolge der geringeren optischen Weglängen eine weitere Verbesserung der Bildqualität erreichbar.

15 Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann, wie nachfolgend beschrieben, so ausgestaltet sein, dass die Probenpositionierung im Strahlengang einer optischen Abbildung automatisiert erfolgt. Damit kann die erfindungsgemäße Vorrichtung in vorteilhafter Weise auch in der Lichtblatmikroskopie eingesetzt werden und zur Probenuntersuchung im Hochdurchsatz
20 verwendet werden. Dazu kann der Mikrokanal der erfindungsgemäßen Vorrichtung in einer weiteren Ausführungsform in einer Schlauchsonde enthalten sein. Die Messzelle kann beispielsweise eine für die Verwendung in einem Lichtblatmikroskop geeignete Messzelle darstellen, wobei die Messzelle für das Lichtblatmikroskop ebenfalls mit einer Flüssigkeit gefüllt ist, was in der Verbesserung der Qualität der optischen Abbildung von Proben im
25 Mikrokanal resultiert. Der Mikrokanal in der Schlauchsonde ist vorzugsweise in der flüssigkeitsgefüllten Messzelle eines Lichtblatmikroskops positionierbar.

Die Messzelle für das Lichtblatmikroskop ist vorzugsweise nach oben hin offen und weist
30 mindestens eine Bohrung für das Einsetzen eines Objektivs zur Fluoreszenzmessung und/oder mindestens eine Bohrung für das Einsetzen eines Beleuchtungsobjektivs für ein Lichtblatt auf. Vorzugsweise weist die Messzelle für das Lichtblatmikroskop eine Bohrung für das Einsetzen eines Objektivs zur Fluoreszenzmessung und zwei Bohrungen für das Einsetzen von zwei um 180°versetzte Beleuchtungsobjektive für zwei Lichtblätter auf.

In einer weiteren Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Vorrichtung mindestens ein Mittel zur Positionsbestimmung von Proben im Mikrokanal, vorzugsweise mindestens eine Lichtschranke, Kamera, eine Messelektrode oder einen Sensor, auf. Diese Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist besonders vorteilhaft, da so die Proben in dem Mikrokanal, wie zum Beispiel Tropfen in einem Probenschlauch, der ein zweiphasiges oder mehrphasiges Fluid enthält, oder Zellen und/oder Sphäroide in einem Mikrokanal, der ein einphasiges Fluid enthält, exakt im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung positioniert werden können. In Kombination mit Pumpen arbeitet das System zudem automatisiert. Das Ausgangssignal des Mittels zur Positionsbestimmung von Proben schaltet die Pumpe(n) definiert ab und das die Proben enthaltende Fluid stoppt unmittelbar. Damit ist eine definierte Vorwahl der Probenposition im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung möglich. Das bereits beschriebene Schwingen der Proben aufgrund der notwendigen Regelung der Pumpe(n) wird eliminiert durch die fluidische Entkopplung der Pumpe(n) vom Mikrokanal und damit von der Probensequenz während der optischen Detektion. Das kann mittels Absperrhähnen erfolgen, die im Bereich zwischen den Druckpumpen und der Messzelle angeordnet sind.

Die Kombination einer nach oben offenen Messzelle mit dem Pumpen-basierten Proben transportsystem bietet hervorragende Voraussetzungen beispielsweise für tomografische Bildaufnahmeverfahren in seriellem Durchsatz. Wünschenswert wäre eine Feinjustierung, um beispielsweise tomographische Aufnahmen der Probe erzeugen zu können. Dieses Problem wird durch eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung gelöst, wobei die Vorrichtung ein Mittel zum automatischen Bewegen der Schlauchsonde, die einen Mikrokanal aufweist, innerhalb der mit einer Flüssigkeit gefüllten Messzelle des Lichtblattmikroskops, vorzugsweise einen Piezoantrieb, aufweist. Dieses Mittel zum automatischen Bewegen des Mikrokanals dient der Feinjustierung und ermöglicht es, den Probenschlauch in beliebigen Richtungen im Raum zu bewegen und so die Probe aus verschiedenen Richtungen zu charakterisieren oder z-Stapel zu erzeugen und somit eine räumliche Charakterisierung der Proben und der in den Proben befindlichen Zellen und/oder 3D Zellstrukturen zu realisieren.

Die Erfindung stellt weiterhin eine Messzelle für die optische Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in Mikrokanälen bereit.

Durch die Messzelle wird ein Mikrokanal geführt, wobei die Messzelle Durchführungen zum Befüllen der Messzelle mit einer Flüssigkeit, zum Entlüften der Messzelle, zum Durchführen von Lichtquellen und Sensoren, beispielsweise von Lichtleitern zur Einkopplung von Licht in die Messzelle oder von Lichtschranken oder Elektroden zur Positionsbestimmung von Proben im Mikrokanal oder zum Durchführen von Objektiven zum Emittieren und Detektieren von elektromagnetischer Strahlung aufweist. Erfindungsgemäß ist die Messzelle mit einer Flüssigkeit gefüllt, der Mikrokanal befindet sich innerhalb der Messzelle in der Flüssigkeit und der Mikrokanal innerhalb der Messzelle und/oder die Messzelle mit dem Mikrokanal ist manuell oder automatisch bewegbar.

10

Die Vorrichtung und die Messzelle sind in vorteilhafter Weise dazu geeignet, eine definierte Vorwahl der Probenposition im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung eines Mikroskops zu ermöglichen und optische Abbildungen von Proben im Mikrokanal in verbesserter Qualität bereitzustellen. Das Erzeugen von optischen Abbildungen von Proben im Mikrokanal ist mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung automatisierter und für die Untersuchung von Proben im Hochdurchsatz anpassbar. Weitere Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung ermöglichen das Erzeugen tomografischer Bildaufnahmen in seriellem Durchsatz.

15

In diesem Zusammenhang stellt die Erfindung auch ein Verfahren zur optischen Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in einem Mikrokanal mittels der hierin beschriebenen Vorrichtung bereit, wobei sich der Mikrokanal innerhalb einer erfindungsgemäßen Messzelle befindet, die mit einer Flüssigkeit gefüllt ist, und das Verfahren die Schritte umfasst:

25

- a) Bereitstellen eines Proben-enthaltenden einphasigen, zweiphasigen oder mehrphasigen Fluids in einem Mikrokanal; und
- b) Positionieren der in dem Mikrokanal enthaltenen Proben im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung eines Mikroskops,

dadurch gekennzeichnet, dass die Positionierung der in dem Mikrokanal enthaltenen Proben im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung erfolgt durch

30

- c) manuelles axiales Verschieben und/oder Rotieren des Mikrokanals gegenüber der Messzelle; oder
- d) automatisches Bewegen des Mikrokanals innerhalb der mit einer Flüssigkeit gefüllten Messzelle, vorzugsweise mittels eines Piezoantriebs;

- e) automatisches oder manuelles Bewegen der mit einer Flüssigkeit gefüllten Messzelle, die den Mikrokanal enthält, mittels Bewegung des Mikroskoptisches in den drei Raumrichtungen.

- 5 Das automatische Bewegen der mit einer Flüssigkeit gefüllten Messzelle, die den Mikrokanal enthält, erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform durch Bewegen des Mikroskoptisches in den drei Raumrichtungen mittels Schrittmotoren.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Positionierung
10 von in dem Mikrokanal enthaltenen Proben erfolgen durch

- f) Bewegen der Tropfen im Probenschlauch mittels einer oder mehrerer Pumpen und Stoppen der Pumpe(n), wenn sich die Probe im Bereich des Strahlengangs der optischen
Abbildung befindet; oder
- g) exaktes Bewegen der Tropfen im Probenschlauch mittels einer oder mehrerer Pumpen,
15 Stoppen der Pumpe(n) und fluidisches Entkoppeln der Pumpe(n) von der Tropfensequenz im Mikrokanal mittels Ventilen von der Tropfensequenz im Probenschlauch, wenn sich die Probe im Bereich des Strahlengangs der optischen
Abbildung befindet.

20 Besonders bevorzugt ist es, wenn in dem erfindungsgemäßen Verfahren die Positionierung von in dem Mikrokanal enthaltenen Proben erfolgt durch

- h) automatische Erkennung von Proben im Mikrokanal mit Hilfe eines Mittels zur
Positionsbestimmung der Proben im Mikrokanal, vorzugsweise mittels einer Kamera,
einer Messelektrode oder mittels Lichtschranken und Stoppen der Pumpe(n), wenn sich
25 die Probe im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung befindet.

Zum Bewegen der Tropfen im Probenschlauch können beispielsweise eine Schlauchpumpe
(Rollenpumpe) oder Druckpumpen, die vorzugsweise mit verschiedenen Drücken (Druck,
Unterdruck) arbeiten, wobei wechselnde Druckverhältnisse mittels Drucksensoren geregelt
30 werden, verwendet werden.

Für die erfindungsgemäße Messzelle und das erfindungsgemäße Verfahren gelten die gleichen
bevorzugten Ausgestaltungen und Ausführungsformen, wie für die erfindungsgemäße

Vorrichtung beschrieben, so dass auf die detaillierte Beschreibung der erfindungsgemäßen Vorrichtung Bezug genommen wird und auf weitere Wiederholungen verzichtet wird.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren haben zahlreiche Vorteile. Für die tropfenbasierte Mikrofluidik und insbesondere für die technologische Plattform „*pipe based bioreactors*“ spielt die schnelle, reproduzierbare und hochaufgelöste optische Detektion biologischer Proben eine dominierende Rolle. Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren können als einfaches Durchflusssystem für mikroskopische/spektroskopische Routineuntersuchungen bis hin zu Anwendungen für automatisierte, tomografiebasierte bildgebende Verfahren eingesetzt werden und besitzen damit ein breites Anwendungspotenzial. Sowohl für die Messzelle im Lichtblatmikroskop als auch für die Messzelle am Aufrecht-/Inversmikroskop ist auch die Möglichkeit des gleichmäßigen, kontinuierlichen Flusses der Tropfen gegeben. Beim Lichtblatmikroskop könnten damit tomografische Untersuchungen im Durchfluss durchgeführt werden. Voraussetzung ist, dass die Bilder schnell genug aufgenommen und durch den PC verarbeitet werden können. Dies wurde bereits erfolgreich durch Jiang, H. *et al* (2017) demonstriert. Ebenso ist es möglich, einphasige Fluide bzw. darin befindliche Objekte wie Zellen oder 3D-Zellstrukturen zu untersuchen. Auch für die einphasigen Fluide besteht die Möglichkeit, diese bzw. darin befindliche 3D-Zellstrukturen kontinuierlich oder im Start-Stopp-Betrieb zu untersuchen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von 12 Zeichnungen näher veranschaulicht.

Es zeigen:

25

Figur 1 die Herstellung von Tropfen aus Zellkulturmedium (DMEM, grau) kompartimentiert in einem öligen Fluid (PFD, transparent);

Figur 2 den Aufbau einer erfindungsgemäßen Messzelle;

Figur 3 eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Messzelle als Mikroskopierzelle;

30 **Figur 4** weitere Ausführungsformen der Messzelle als Glasküvette und als materialunabhängige Messzelle mit Tauchobjektiven;

- Figur 5** weitere Ausführungsformen der Messzelle mit einseitiger Zu- und Abführung des Schlauches, als geschlossene Messzelle und als nach oben hin offene Messzelle;
- Figur 6** die Unterschiede zwischen mikroskopischen Aufnahmen von Zellen in Tropfen, die sich in einem PTFE-Schlauch befinden, mit und ohne erfindungsgemäße Messzelle;
- Figur 7** Varianten zum Bewegen und Positionieren der Tropfen im Bereich des Strahlenganges der optischen Abbildung eines Mikroskops;
- Figur 8** Prinzipdarstellungen der Messzelle für ein Lichtblattmikroskop;
- Figur 9** eine Prinzipdarstellung des fluidischen Regimes am Lichtblattmikroskop;
- Figur 10** ein Zudosiermodul für die erfindungsgemäße Messzelle auf der Basis der Bestimmung von Position und Geschwindigkeit der Proben mittels zwei Lichtschranken;
- Figur 11** Prinzipdarstellung des fluidischen Regimes am aufrechten oder inversen Mikroskop; und
- Figur 12** die Positionserkennung von Stammzellsphäroiden in einem Tropfen in einem Mikrokanal.

Figur 1 zeigt Teile eines „*pipe based bioreactors*“ (*pbb*) des Standes der Technik. Tropfen (20) aus Zellkulturmedium (DMEM, grau gefärbt) werden in einem aus Polycarbonat bestehenden mikrofluidischen Modul generiert und sind durch ein öliges Fluid (PFD, transparent) getrennt. **Fig. 1A** veranschaulicht die Tropfengenerierung. Im rechten Bereich des Kanals des mikrofluidischen Moduls befindet sich der Anschluss des Probenschlauches (13). **Fig. 1B** zeigt die Tropfensequenz in einem auf eine Schlauchdisk (50) aufgewickelten Probenschlauch (13). Die Schlauchdisk (50) mit den darin befindlichen Kompartimenten (Tropfen (20)) kann mehrere Wochen im Inkubator kultiviert werden, wobei in bestimmten Abständen eine Detektion der in den Tropfen (20) befindlichen Zellen erfolgen muss. Dazu wird im einfachsten Fall die Schlauchdisk (50) aus dem Inkubator entnommen und mikroskopiert.

Jeder Tropfen (20) kann dabei als „Mikrobioreaktor“ betrachtet werden. Die wässrigen Tropfen (20) werden mit einem mit Wasser nicht mischbarem Fluid separiert, beispielsweise einem Öl.

In dem hier gezeigten Fall handelt es sich dabei um Perfluordecalin (PFD). PFD ist biologisch völlig inert, hat eine hohe Sauerstoffaufnahmekapazität und wird im medizinischen Bereich beispielsweise zum Transport von Transplantaten verwendet. Der Probenschlauch (13), aufgrund der Notwendigkeit hydrophober Oberflächeneigenschaften vorzugsweise entweder aus Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Fluorethylenpropylen (FEP) bestehend, hat vorzugsweise eine Länge von drei Metern, ist auf einer Disk (50) aufgewickelt (Fig. 1B) und fasst bis zu 900 Tropfen.

Fig. 2A zeigt den Schnitt durch eine Messzelle (10) und verdeutlicht die Aufgabe der in der Messzelle (10) befindlichen Flüssigkeit (14). Diese ist im hier gezeigten Fall Wasser. Das Wasser (14) gleicht Unebenheiten der Außenfläche des Probenschlauches (13) aus und verhindert dadurch Lichtstreuungen, die im Fall ohne Wasser (14) (Brechungsindex $n_{\text{Wasser}}=1,333$) beim Übergang des Lichts von Luft (Brechungsindex $n_{\text{Luft}}=1$) in den Probenschlauch (13) (Brechungsindex $n_{\text{FEP}}=1,344$) und aus dem Probenschlauch (13) in die Luft zurück signifikant wären. Streueffekte würden eine deutlich schlechtere Abbildung verursachen (siehe auch die Figuren 6A und 6B) als bei der Verwendung von Wasser (14) als Umgebungsmedium (siehe Figuren 6C und 6D). **Fig. 2B** zeigt die technische Realisierung der Messzelle (10) als Mikroskopiermodul mit durchgeführtem Probenschlauch (13), (15: Eingang, 16: Ausgang) sowie dem Anschluss (17) zum Befüllen der Messzelle (10) mit einer wässrigen Flüssigkeit (14) und Anschluss (18) zum Entlüften der Kammer der Messzelle (10). Der Probenschlauch (13) kann über die Anschlüsse (15), (16) durch die Messzelle (10) gezogen werden (in Richtung der Pfeile bzw. in umgekehrter Richtung) und/oder um die Achse des Probenschlauches (13) gedreht werden. Dadurch ist es möglich, die im Probenschlauch (13) befindlichen Proben (20), z.B. Kompartimente, exakt im Bereich des Strahlenganges des Mikroskopobjektivs (nicht gezeigt) zu positionieren. Diese Möglichkeit des Ziehens und Drehens des Probenschlauches (13) ist für den Fall der Verwendung von Spritzenpumpen zum Probentransport essenziell, da mit Spritzenpumpen ein exaktes Positionieren der Tropfen (20) nicht möglich ist. Im Fall der Verwendung von druckbasierten Pumpsystemen ist ein exaktes Positionieren des Tropfens (20) auch ohne die Relativbewegung des Schlauches (13) möglich. Zur Abdichtung der Kammer der Messzelle (10) wurden Glasplatten (12) (Deckgläser: $n_{\text{Glas}}=1,5255$) verwendet. Dies ist von Vorteil, da die Lichtübergänge optisch korrigiert werden können.

Die Messzelle (10) kann mit einem externen Konditionierungsmodul verbunden werden, z.B. über die Anschlüsse (17) und (18) in **Fig. 2B**, und eine Pumpe fördert dann über die Schläuche (13') konditionierte Flüssigkeit aus dem Konditioniermodul durch die Messzelle (10) und zurück zum Konditionierungsmodul (Kreislauf). Die Konditionierung der Flüssigkeit (14) kann folgende Parameter umfassen: Wassertemperatur T, O₂- und CO₂-Konzentration. Ein Gasaustausch ist beispielsweise über einen aus PTFE bestehenden Probenschlauch (13) in bestimmten Grenzen möglich, dadurch ist die Konditionierung des O₂- und des pH-Wertes im Tropfen (20) möglich. Die Möglichkeit zur Konditionierung erlaubt damit auch länger dauernde Untersuchungen in der Messzelle (10).

Durch die an der Messzelle (10) vorhandenen Anschlüsse (17, 18) ist es auch möglich, die in der Messzelle vorhandene Flüssigkeit (14) auszutauschen und deren Zusammensetzung so anzupassen, dass die Flüssigkeit (14) einen Brechungsindex aufweist, der mit der Wandung des Probenschlauchs (13) und dem sich in dem Probenschlauch (13) befindlichen Fluid vergleichbar ist. Dazu kann die Vorrichtung (200) ein Mittel zum Einstellen des Brechungsindex der Flüssigkeit (14) in der Messzelle (10) auf. Dabei handelt es sich beispielsweise um ein System mit mindestens einem Vorratsbehälter für Flüssigkeiten und mindestens einer Pumpe sowie entsprechenden Schläuchen (13'), mit deren Hilfen die Messzelle mit der gewünschten Flüssigkeit (14) befüllbar ist.

Figur 3 zeigt eine Ausführungsform der Messzelle (10). **Fig. 3A** zeigt die einfachste Ausführungsform der Anordnung der Messzelle (10) als Mikroskopierzelle. Zu erkennen ist die Position des Objektivs (30) für die Lichtmikroskopie oder die Epifluoreszenzmikroskopie. In dem vom Rahmen (11) und den Glasfenstern (12) gebildeten Raum befindet sich als Flüssigkeit (14) Wasser oder alternativ ein Öl, wie Perfluordecalin. Die in Fig. 2B dargestellten Anschlüsse (17) und (18) zum Befüllen der Kammer der Messzelle (10) können auch belegt werden durch beispielsweise Lichtleiter (22), die Licht in die Proben (20) im Schlauch (13) einkoppeln und darin befindliche Fluoreszenzfarbstoffe anregen (**Fig. 3B**). Spektroskopische (Turbidimetrie, Nephelometrie, u.a.) Messungen und Kombinationen aus unterschiedlichen optischen Detektionsmethoden sind realisierbar. Es ist möglich, mehrere parallel angeordnete optische und fluidische Ein/Ausgänge im Bereich der Anschlüsse (17) und (18) zu realisieren. **Fig. 3C** zeigt die Draufsicht des in **Fig. 3A** gezeigten Bildes.

Figur 4 zeigt weitere Ausführungsformen der Messzelle (10). In **Fig. 4A** wird der Schlauch (13) durch eine Messzelle (10) geführt, die als Glasküvette ausgeführt ist. Diese weist einen Deckel und einen Boden auf, in denen der Probenschlauch (13) abgedichtet und dreh- und verschiebbar geführt ist (vergleichbar mit Fig. 2). Die Messzelle (10) ist mit einer Flüssigkeit (14), wie Wasser oder einem Öl, gefüllt. Die Beleuchtung kann wiederum beidseitig erfolgen. **Fig. 4B** zeigt eine Anordnung mit einem materialunabhängigen Gehäuse der Messzelle (10), das wiederum mit einer Flüssigkeit (14), wie Wasser oder einem Öl gefüllt ist und Tauchobjektive (30) verwendet. Die Schlauchdurchführung und Schlauchbewegung erfolgt analog zu den bisher vorgestellten Varianten der Messzellen (10).

Figur 5 zeigt weitere Ausführungsformen der Messzelle (10). In **Fig. 5A** ist die Messzelle (10) geschlossen, mit Wasser (14) befüllt und die Schlauchdurchführungen sind mit Dichtungen (21) versehen. Der Probenschlauch (13) kann an einem Ende gezogen und in gleicher Weise gleichzeitig am anderen Ende geschoben werden oder nur an einem Ende gezogen oder nur an einem Ende geschoben werden oder an beiden Enden gleichzeitig gezogen oder geschoben werden. In **Fig. 5B** ist die Messzelle (10) nach oben hin offen, aber ebenfalls mit Wasser (14) befüllt. In diesem Fall erfolgt die Fixierung des Probenschlauches (13) nicht an der Messzelle (10) (vgl. **Fig. 5A**), sondern unabhängig von der Messzelle (10). Der so fixierte Probenschlauch (13) kann als Ganzes in alle Raumrichtungen bewegt und in gewissen Grenzen auch gedreht werden. Die beiden in **Fig. 5A** und **Fig. 5B** gezeigten Ausführungsformen sind sowohl als Glasküvette, als auch als materialunabhängiges Gehäuse realisierbar (vgl. Fig. 4). „Materialunabhängiges“ Gehäuse bedeutet, dass das Gehäuse aus allen geeigneten Materialien bestehen kann, wie beispielsweise Glas, einem Kunststoff, einem Metall oder Kombinationen oder Verbunden davon, vorausgesetzt, dass die in diesem Fall Durchführungen in die Gehäusewände einbringbar sind, die es ermöglichen, Objektive (30) eines Mikroskops, wie in Fig. 4B gezeigt, in die Messzelle (10) einzubringen.

Figur 6 verdeutlicht die Unterschiede zwischen mikroskopischen Aufnahmen von Zellen in Tropfen (20), die sich in einem Probenschlauch (13) aus PTFE befinden. **Fig. 6A** und **6B** wurden durch einen Probenschlauch (13) ohne Messzelle (10) aufgenommen, bei den **Fig. 6C** und **6D** befand sich der Probenschlauch (13) in einer mit Wasser (14) befüllten Messzelle (10) (vgl. Fig. 2B). Untersucht wurden KG1-Zellen in RPMI-Medium, segmentiert mit PFD in vergleichbaren Probenschläuchen (13) (PTFE-Schlauch, $d_i=1,0\text{mm}$, $d_a=1,60\text{ mm}$). Es erfolgten Phasenkontrastaufnahmen unter folgenden Bedingungen:

- Fig. 6A: 40x Vergrößerung, ohne Messzelle (10).
Fig. 6B: 600x Vergrößerung, fokussiert auf Zellansammlung im Bereich des markierten Quadrates in Fig. 6A, ohne Messzelle (10).
Fig. 6C: 40x Vergrößerung, mit Messzelle (10), gefüllt mit Wasser (14).
5 Fig. 6D: 600x Vergrößerung, fokussiert auf Zellansammlung im Bereich des markierten Quadrates in Fig. 6C, mit Messzelle (10), gefüllt mit Wasser (14).

Figur 7 zeigt zwei Varianten zum Bewegen und Positionieren der Tropfen (20) im Bereich des Strahlenganges der optischen Abbildung mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung (200).
10 Hier ist eine spezielle Variante für eine mikroskopische Charakterisierung von Tropfen (20) und darin befindlichen Zellen in einem Lichtblatmikroskop, angedeutet durch die Objektive (30) des Lichtblatmikroskops, dargestellt. **Fig. 7A** zeigt den relativ einfachen Aufbau auf der Basis einer Spritzenpumpe (60). **Fig. 7B** zeigt den Aufbau mit Pumpen (70, 70'). Die Pumpen (70, 70') sind hier als Druckpumpen ausgeführt. Um die Tropfen (20) exakt im Bereich der
15 optischen Abbildung positionieren zu können, ist eine Tropfenpositionsbestimmung (41) erforderlich. Das kann mittels einer Lichtschranke erfolgen, kann aber auch mit einer Kamera und einer schnellen Bildauswertung realisiert werden. Das Ausgangssignal der Tropfenpositionsbestimmung (41) schaltet die Pumpe (60) ab, wobei sich im Fall der Spritzenpumpe die Tropfensequenz weiterbewegt und erst nach einem Druckausgleich im
20 Probenschlauch (13) zum Stehen kommt. Die in **Fig. 7B** dargestellte technische Lösung beruht auf der Anwendung von druckbasierten Pumpen und umgeht das oben geschilderte Problem des Nachlaufens der Tropfensequenz. Auch hier ist ein System zur Bestimmung der Tropfenposition (41) notwendig. Das von diesem System ausgehende Signal schaltet die Druckpumpen (70, 70') definiert ab und die Tropfensequenz stoppt unmittelbar. Damit ist eine
25 definierte Vorwahl der Tropfenposition im Bereich des Strahlenganges der optischen Abbildung möglich. Das bereits beschriebene Schwingen der Tropfen aufgrund der notwendigen Regelung der Druckpumpen (70, 70') wird eliminiert durch die fluidische Entkopplung der Druckpumpe(n) (70, 70') vom Probenschlauch (13) und damit von der Tropfensequenz während der optischen Detektion. Das kann mittels Absperrhähnen (90, 90') erfolgen, die im
30 Bereich zwischen den Druckpumpen (70, 70') und der Messzelle (10) angeordnet sind. Besonders vorteilhaft ist, wenn die Absperrhähne (90, 90') keine Volumenverdrängung im Probenschlauch (13) hervorrufen, anderenfalls würden die Tropfen (20) undefiniert sprunghafte Bewegungen ausführen; und dass die Tropfen (20) nicht durch die Absperrhähne (90, 90') transportiert werden, was durch die Positionierung der Absperrhähne (90) und (90') zwischen

Vorratsbehälter und Schlauchdisk (50, 50') gegeben ist. Andernfalls würde dies zu undefinierten Adhäsionseffekten in den Absperrhähnen (90, 90') führen. Nach Abschluss der Tropfendetektion schalten die Absperrhähne (90, 90') wieder auf Durchgang, und die Druckpumpen (70, 70') fördern den nächsten Tropfen der Tropfensequenz in den Bereich der optischen Abbildung des Mikroskops. Eine Feinjustierung (40) kann beispielsweise durch Bewegen des Mikroskoptisches oder durch einen Piezoaktuator erfolgen. So bietet die Kombination einer offenen Messzelle (vgl. Fig. 5B) mit dem Tropfentransportsystem mit Druckpumpen (70, 70') gemäß **Fig. 7B** hervorragende Voraussetzungen beispielsweise für tomografische Bildaufnahmeverfahren in seriellem Durchsatz. Die Feinjustierung (41) ermöglicht es, den Probenschlauch (13) in beliebigen Richtungen zu bewegen (z.B. mit Piezoaktoren) und so die Tropfen (20) aus verschiedenen Richtungen zu charakterisieren oder z-Stapel zu erzeugen und somit eine räumliche Charakterisierung der Tropfen (20) und der in den Tropfen (20) befindlichen Zellen bzw. 3D-Zellstrukturen zu realisieren. Die Zellen bzw. 3D-Zellstrukturen werden in Schlauchdisks (50, 50') über eine vorbestimmte Dauer kultiviert. Zur Beförderung der Proben (20) in dem Probenschlauch (13) wird mittels der Druckpumpen (70, 70') Fluid aus dem Vorratsbehälter (91) in den Vorratsbehälter (91') oder umgekehrt gefördert.

In einer einfacheren Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Vorrichtung (200) anstelle der Druckpumpen (70, 70') auch eine Schlauchpumpe enthalten. Die Absperrhähne (90, 90') können dann ggf. entfallen.

Figur 8 zeigt Details einer Schlauchsonde (100) mit Mikrokanal bzw. Probenschlauch (13), die speziell für die Messzelle (120) eines Lichtblattmikroskops entwickelt und getestet wurde. Die Messzelle (120) befindet sich örtlich arretiert im Lichtblattmikroskop, kann aber vom Anwender herausgenommen und wiedereingesetzt werden. In die Messzelle (120) ragen die beiden um 180° versetzten Beleuchtungsobjektive (vgl. (30) in Figs. 7A und 7B) sowie ein Objektiv zur Erfassung der Fluoreszenz (siehe **Fig. 8C**). Die Messzelle (120) ist mit Wasser oder einer nichtwässrigen Flüssigkeit gefüllt. Dies dient der Angleichung der Brechungsindizes. Die Schlauchsonde (100) mit Probenschlauch (13) ragt frei beweglich in die Messzelle (120) und die darin befindliche Flüssigkeit, ist dabei jedoch mit dem Piezoantrieb (110) des Lichtblattmikroskops verbunden, der die Schlauchsonde (100) in drei Raumrichtungen verfahren und drehen kann.

Fig. 5B zeigt eine Prinzipdarstellung der Schlauchsonde (100) mit Mikrokanal bzw. Probenschlauch (13), positioniert in der Messzelle (10) eines Lichtblattemikroskops. **Fig. 8A** zeigt den Teil der Schlauchsonde (100) mit Probenschlauch (13), der sich in der Messzelle (120) befindet. **Fig. 8B** zeigt die Schlauchsonde (100) in der Messzelle (120), mit der Türkamera (41) des Lichtblattemikroskops aufgenommen. Die Schlauchsonde (100) weist ein Mikroskopierfenster (111) auf, das sich im Strahlengang der optischen Bilderzeugung des Mikroskops befindet. **Fig. 8C** zeigt eine 3D-Darstellung der Messzelle (120) und der Schlauchsonde (100) (Fig. 8B „aus dem Blatt heraus“, die Bohrung (130) ist für die Aufnahme eines Objektivs zur Fluoreszenzmessung vorgesehen, siehe auch Fig. 9). **Fig. 8D** zeigt die Seitenansicht von **Fig. 8C**. Die Bohrung (140) ist für den Einsatz eines der zwei um 180° versetzten Beleuchtungsobjektive für die Lichtblätter 1 und 2 vorgesehen (siehe auch **Fig. 9**).

Figur 9 zeigt eine Prinzipdarstellung des fluidischen Regimes am Lichtblattemikroskop. Für die optischen Aufnahmen der Zellkulturen in den Tropfen (20) ist es essenziell, dass die Tropfen (20) während der bis zu mehreren Minuten dauernden Aufnahmen ihre Position im Probenschlauch (13) keinesfalls verändern, was zu unscharfen Aufnahmen führen würde. Die für die tomografischen Aufnahmen notwendigen Veränderungen der Position der im Tropfen (20) befindlichen biologischen Objekte erfolgt durch die Bewegung der kompletten Schlauchsonde (100) durch den Piezoantrieb (110) des Lichtblattemikroskops, siehe **Fig. 8**. Für die Tropfen (20) ergeben sich zwei Zustände: i) während der Messung dürfen sich die Tropfen (20) im Probenschlauch (13) nicht bewegen und ii) nach der Messung muss die komplette Tropfensequenz im Probenschlauch (13) so bewegt werden, dass der nächste Tropfen (20) in die Fokusebene der Objektivs (30) gelangt und dort definiert gestoppt wird. Die Realisierung dieser beiden Zustände wird nachfolgend beschrieben:

Die Pumpen (70, 70') erzeugen in den beiden Vorratsbehältern (91, 91') einen Überdruck P1 bzw. einen Unterdruck P2. Die Tropfen (20) beginnen sich unmittelbar nach Applikation des Drucks gleichmäßig aus der Schlauchdisk (50) in Richtung der Messzelle (120) zu bewegen. Der Bereich des Fensters (111) der Schlauchsonde (100) (**Fig. 8B**) wird mit einer Videokamera (41) (Türkamera des Lichtblattemikroskops) überwacht und die Ergebnisse werden permanent in ein Matlab-Programm übernommen. Dabei wird eine Lichtintensität einer imaginären Linie ((150) in **Fig. 8C und 8D**) ausgewertet. Gelangt ein Tropfen (20) im Probenschlauch (13) in diesen Bereich des Fensters (111) der Schlauchsonde (100), ändert sich die Lichtintensität im Bereich dieser Linie (150), was von Matlab ausgewertet und dann als Signal zum Stoppen der Pumpen (70, 70') ausgegeben wird. Die Tropfensequenz bleibt dann unmittelbar stehen, der zu

messende Tropfen (20) befindet sich im Bereich des optischen Strahlengangs des Lichtblattmikroskops. Die Pumpen (70, 70') regeln nach wie vor auf einen bestimmten Druckwert, was sich in einem „Zittern“ des Tropfens (20) äußern würde. Um dies zu vermeiden, schalten unmittelbar nach dem Stoppen der Tropfensequenz die Ventile (90) und (90') und
5 entkoppeln die Pumpen (70, 70') und die Vorratsbehälter (90, 90') von der Tropfensequenz. Dadurch behalten der Tropfen (20) im optischen Strahlengang des Lichtblattmikroskops und auch die gesamte Tropfensequenz eine stabile Position und die Fluoreszenzmessung mit dem Lichtblattmikroskop kann durchgeführt werden. Nach Abschluss der Messung werden die Ventile (90) und (90') wieder geöffnet, die Pumpen (70, 70') gestartet und der nächste Tropfen
10 (20) der Tropfensequenz in den Bereich des Fensters (111) der Schlauchsonde (100) gefördert. Die Positionierung und der Start der Messung erfolgt erneut wie oben beschrieben.

In der in Figur 9 gezeigten Anordnung der Vorrichtung (200) können die Pumpen als Druckpumpen (70, 70') ausgeführt sein, die vorzugsweise mit verschiedenen Drücken (Druck, Unterdruck) arbeiten, wobei wechselnde Druckverhältnisse mittels Drucksensoren geregelt
15 werden.

Neben der hier beschriebenen Positionsbestimmung der Tropfen (20) ist auch die Positionsbestimmung mittels Lichtschranken, Messelektroden oder Sensoren möglich, die gleichzeitig
20 auch die Bestimmung der Tropfengeschwindigkeit erlauben würden.

Figur 10 zeigt die Messzelle (10) gemäß Figur 2B mit aufgesetztem Zudosiermodul (160). In diesem Zudosiermodul (160) werden die Position und die Geschwindigkeit der Tropfen (20) mittels zweier Lichtschranken (162, 162') bestimmt, um mittels eines Mikroventils (zu sehen
25 durch das Kabel (161) definiert und zielgenau Wirkstoffe in die Tropfen (20) schießen zu können. Diese Lichtschranken (162, 162') sind prinzipiell auch in die Messzelle (10) direkt integrierbar, beispielsweise an deren Seitenflächen, wo sie den Mikroskopiervorgang nicht stören. Für das fluidische Regime der hier gezeigten Messzelle (10) mit Zudosiereinrichtung (160) gelten prinzipiell die gleichen Randbedingungen wie für die des Lichtblattmikroskops.
30 Die Tropfen (20) sollen im Bereich des optischen Strahlengangs stabil positioniert werden. Dazu kann die gleiche fluidische Peripherie wie für die Messungen am Lichtblattmikroskop verwendet werden (siehe Schema in **Figur 11**). Im Gegensatz zum Lichtblattmikroskop, bei dem die Türkamera (41) und die daran angeschlossene Matlab-Software die Schaltsignale für die Pumpen (70, 70') und die Ventile (90) und (90') zur Verfügung stellen, würden die Signale

hier von den in Messzelle (10) zu integrierenden Lichtschranken (162, 162') bzw. der daran angeschlossenen Hardware zur Signalaufbereitung geliefert werden.

5 Sind die Mikroskope mit automatisierten Objektischen ausgerüstet, kann neben dem Positionieren der Tropfen (20) im Probenschlauch zusätzlich die Messzelle (10) in drei Raumrichtungen bewegt werden, was mit der Schlauchsonde (100) im Lichtblattmikroskop ähnlich durchgeführt wird (Bewegen der gesamten Schlauchsonde (100) einschließlich Probenschlauch (13) mittels Piezoaktor (110)). Die Kopplung der Signalaufbereitung der Lichtschranken (162, 162') mit der Steuersoftware des jeweiligen Mikroskops eröffnet zudem
10 die Möglichkeit für automatisierte tomografische Untersuchungen der Tropfen (20).

Figur 12B zeigt ein Stammzellsphäroid (mit Kästchen markiert) in einem Tropfen (20). **Figur 12A** zeigt den zugehörigen Signalverlauf einer Lichtschranke mit deutlichen Signaländerungen an den Phasengrenzen des Tropfens (20) und im Bereich des Stammzellsphäroiden.

15

Liste der Bezugszeichen

	10	Messzelle
	11	Rahmen
5	12	Platte aus lichtdurchlässigen Material, Glasplatte
	13	Mikrokanal, Probenschlauch
	13'	Schlauch
	14	wässrige Flüssigkeit, Wasser, Puffer, Nährmedium
	15	Eingang für Mikrokanal, Probenschlauch
10	16	Ausgang für Mikrokanal, Probenschlauch
	17, 18	Anschlüsse für Konditionierungsschlauch oder Lichtleiter
	19	Dichtung für Gehäuse der Messzelle
	20	Probe, Tropfen
	21	Dichtung für Mikrokanal
15	22	Lichtleiter
	30	Mikroskop, Objektiv, Lichtblatt
	40	Feinjustierung
	41	Kamera, Videokamera, Türkamera
	50, 50'	Schlauchdisk
20	60	Spritzenpumpe
	70, 70'	Pumpen, Druckpumpen
	P1, P2	Druck, Unterdruck
	90, 90'	Ventil, Absperrhahn
	91, 91'	Vorratsbehälter
25	92	Druckschlauch
	100	Schlauchsonde
	110	Mittel zum automatischen Bewegen der Schlauchsonde, Piezoantrieb
	111	Mikroskopierfenster
	120	Messzelle für Lichtblatmikroskop
30	130	Bohrung für Fluoreszenzobjektiv
	140	Bohrung für Einkopplung Lichtblatt
	150	Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung
	160	Zudosierungsmodul
	161	Mikroventil

162, 162' Lichtleiter
200 Vorrichtung

Referenzen

5 Jiang, H., *et al.* (2017) Droplet based light-sheet fluorescence microscopy for high-throughput sample preparation, 3-D imaging and quantitative analysis on a chip. *Lab Chip*, 17, 2193 ff.

10 Deschout, H. et al.; (2014) On-chip light sheet illumination enables diagnostic size and concentration measurements of membrane vesicles in biofluids. *Nanoscale*, 6(3):1741-7.

Paiè, P. et al. (2016) Selective plane illumination microscopy on a chip. *Lab Chip*, 16, 1556-1560.

Patentansprüche

1. Vorrichtung (200) für die optische Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in einem Mikrokanal (13), umfassend eine Messzelle (10, 120), wobei der Mikrokanal (13) durch die Messzelle (10, 120) geführt wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle (10, 120) mit einer Flüssigkeit (14) gefüllt ist, der Mikrokanal (13) sich innerhalb der Messzelle (10, 120) in der Flüssigkeit (14) befindet, das Fluid und/oder darin eingeschlossener Objekte in dem Mikrokanal (13) bewegbar sind und der Mikrokanal (13) innerhalb der Messzelle (10, 120) und/oder die Messzelle (10, 120) mit dem Mikrokanal (13) manuell oder automatisch bewegbar ist.
2. Vorrichtung (200) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung (200) zur Positionierung von Proben (20) im Mikrokanal (13) im Strahlengang eines Mikroskops am Eingang (15) des Mikrokanals (13) in die Messzelle (10, 120) eine Pumpe (70) oder am Eingang (15) des Mikrokanals (13) in die Messzelle (10, 120) eine Pumpe (70) und am Ausgang (16) des Mikrokanals (13) aus der Messzelle (10, 120) eine Pumpe (70'), oder am Ausgang (16) des Mikrokanals (13) aus der Messzelle (10, 120) eine Pumpe (70') aufweist.
3. Vorrichtung (200) nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung (200) vor dem Eingang (15) des Mikrokanals (13) in die Messzelle (10, 120) ein Ventil (90) und/oder nach dem Ausgang (16) des Mikrokanals (13) aus der Messzelle (10, 120) ein Ventil (90') zur fluidischen Entkopplung der Pumpe(n) (70, 70') vom Mikrokanal (13) aufweist.
4. Vorrichtung (200) nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle (10) ein geschlossenes Gehäuse aufweist und der Eingang (15) des Mikrokanals (13) in die Messzelle (10) und der Ausgang (16) des Mikrokanals (13) aus der Messzelle (10) Mittel zur Abdichtung (21) des Mikrokanals (13) gegenüber dem Gehäuse der Messzelle aufweisen, die die Bewegbarkeit des Mikrokanals (13) innerhalb der Messzelle (10) ermöglichen; und dass der Eingang (15) des Mikrokanals (13) in die Messzelle (10) und der Ausgang (16) des Mikrokanals (13) aus der Messzelle (10) an jeder Außenfläche der Messzelle (10) anordenbar sind;

oder

die Messzelle (120) ein an einer Seite offenes Gehäuse aufweist, durch die der Mikrokanal (13) in die Messzelle (120) hinein- und aus der Messzelle (120) herausragt, wobei ein Teil des in die Messzelle (120) hineinragenden Mikrokanals (13) und ein Teil des aus der Messzelle (120) herausragenden Mikrokanals (13) mittels eines in alle Raumrichtungen bewegbaren und mit der Messzelle (120) nicht in Verbindung stehenden Mittels (110), vorzugsweise mittels eines Piezoantriebes, fest verbunden ist.

5 5. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle (10, 120) aus optisch transparenten Materialien oder optisch nicht transparenten Materialien oder aus einer Kombination oder einem Verbund optisch transparenter und nicht transparenter Materialien besteht.

15 6. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle (10, 120) Durchführungen (17, 18, 130, 140) zum Befüllen der Messzelle (10, 120) mit einer Flüssigkeit (14), zum Entlüften der Messzelle (10, 120), zum Durchführen von Lichtquellen und Sensoren, beispielsweise von Lichtleitern (22) zur Einkopplung von Licht in die Messzelle (10, 120) oder von Lichtschranken (162, 162') oder Elektroden zur
20 Positionsbestimmung von Proben (20) im Mikrokanal (13) oder zum Durchführen von Objektiven (30, 30') zum Emittieren und Detektieren von elektromagnetischer Strahlung aufweist.

25 7. Vorrichtung (200) nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung (200) mindestens ein Mittel zur Positionsbestimmung von Proben (20) im Mikrokanal (13), vorzugsweise mindestens eine Lichtschranke (162, 162'), eine Messelektrode oder eine Kamera (41) aufweist.

30 8. Messzelle (10, 120) für die optische Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Proben (20) in Mikrokanälen (13), wobei durch die Messzelle (10, 120) ein Mikrokanal (13) geführt wird, wobei die Messzelle (10, 120) Durchführungen (17, 18, 130, 140) zum Befüllen der Messzelle (10, 120) mit einer Flüssigkeit (14), zum Entlüften der Messzelle (10, 120), zum Durchführen von Lichtquellen und Sensoren, beispielsweise von

Lichtleitern (22) zur Einkopplung von Licht in die Messzelle (10, 120) oder von Lichtschranken (162, 162') oder Elektroden zur Positionsbestimmung von Proben (20) im Mikrokanal (13) oder zum Durchführen von Objektiven (30, 30') zum Emittieren und Detektieren von elektromagnetischer Strahlung aufweist,

5 dadurch gekennzeichnet, dass

die Messzelle (10, 120) mit einer Flüssigkeit (14) gefüllt ist, der Mikrokanal (13) sich innerhalb der Messzelle (10, 120) in der Flüssigkeit (14) befindet und der Mikrokanal (13) innerhalb der Messzelle (10, 120) und/oder die Messzelle (10, 120) mit dem Mikrokanal (13) manuell oder automatisch bewegbar ist.

10

9. Messzelle (10) nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle (10) ein geschlossenes Gehäuse aufweist und der Eingang (15) des Mikrokanals (13) in die Messzelle (10) und der Ausgang (16) des Mikrokanals (13) aus der Messzelle (10) Mittel zur Abdichtung (21) des Mikrokanals (13) gegenüber dem Gehäuse der Messzelle (10) aufweisen, die die

15 Bewegbarkeit des Mikrokanals (13) innerhalb der Messzelle (10) ermöglichen; und dass der Eingang (15) des Mikrokanals (13) in die Messzelle (10) und der Ausgang (16) des Mikrokanals (13) aus der Messzelle (10) an jeder Außenfläche der Messzelle (10) anordenbar sind.

20

10. Messzelle (120) nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle (120) ein an einer Seite offenes Gehäuse aufweist, durch die der Mikrokanal (13) in die Messzelle (120) hinein- und aus der Messzelle (120) herausragt, wobei ein sich außerhalb der Messzelle (120) befindlicher Teil des in die Messzelle (120) hineinragenden Mikrokanals (13) und ein sich außerhalb der Messzelle (120) befindlicher Teil des aus der Messzelle (120) herausragenden Mikrokanals (13) mittels eines in alle Raumrichtungen bewegbaren und mit der Messzelle (120)

25 nicht in Verbindung stehenden Mittels (110), vorzugsweise mittels eines Piezoantriebes, fest verbunden ist.

30

11. Verfahren zur optischen Charakterisierung von Fluiden und/oder darin eingeschlossener Objekte in einem Mikrokanal (13) mittels einer Vorrichtung (200) oder einer Messzelle (10, 120) nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei sich der Mikrokanal (13) innerhalb einer Messzelle (10, 120) befindet, die mit einer Flüssigkeit (14) gefüllt ist, umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen eines Proben (20)-enthaltenden einphasigen, zweiphasigen oder mehrphasigen Fluids in einem Mikrokanal (13); und

b) Positionieren der in dem Mikrokanal (13) enthaltenen Proben (20) im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung eines Mikroskops, dadurch gekennzeichnet, dass die Positionierung von in dem Mikrokanal (13) enthaltenen Proben (20) im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung erfolgt durch

- 5 c) manuelles axiales Verschieben und/oder Rotieren des Mikrokanals (13) gegenüber der Messzelle (10, 120); oder
- d) automatisches Bewegen des Mikrokanals (13) innerhalb der mit einer Flüssigkeit (14) gefüllten Messzelle (10, 120), vorzugsweise mittels eines Piezoantriebs (110); oder
- 10 e) automatisches oder manuelles Bewegen der mit einer Flüssigkeit gefüllten Messzelle (10, 120), die den Mikrokanal (13) enthält, mittels Bewegung des Mikroskoptisches in den drei Raumrichtungen;

und/oder dass die Positionierung von in dem Mikrokanal (13) enthaltenen Proben (20) erfolgt durch

- 15 f) Bewegen der Tropfen (20) im Mikrokanal (13) mittels einer oder mehrerer Pumpe(n) (70, 70'), und Stoppen der Pumpe(n) (70, 70'), wenn sich die Probe (20) im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung eines Mikroskops befindet; oder
- g) exaktes Bewegen der Tropfen (20) im Mikrokanal (13) mittels einer oder mehrerer Pumpe(n) (70, 70'), Stoppen der Pumpe(n) (70, 70') und fluidisches Entkoppeln der
- 20 Pumpe(n) (70, 70') von der Tropfensequenz im Mikrokanal (13) mittels Ventilen (90, 90'), wenn sich die Probe (20) im Bereich des Strahlengangs der optischen Abbildung eines Mikroskops befindet;

und/oder dass die Positionierung von in dem Mikrokanal (13) enthaltenen Proben (20) erfolgt durch

- 25 automatische Erkennung von Proben (20) im Mikrokanal (13) mit Hilfe eines Mittels zur Positionsbestimmung der Proben (20) im Mikrokanal (13), vorzugsweise mittels einer Kamera (41), einer Messelektrode oder mittels Lichtschranken (22, 162, 162') und Stoppen der Pumpe(n) (70, 70'), wenn sich die Probe (20) im Bereich des Strahlengangs der optischen
- 30 Abbildung eines Mikroskops befindet.

FIG 1A

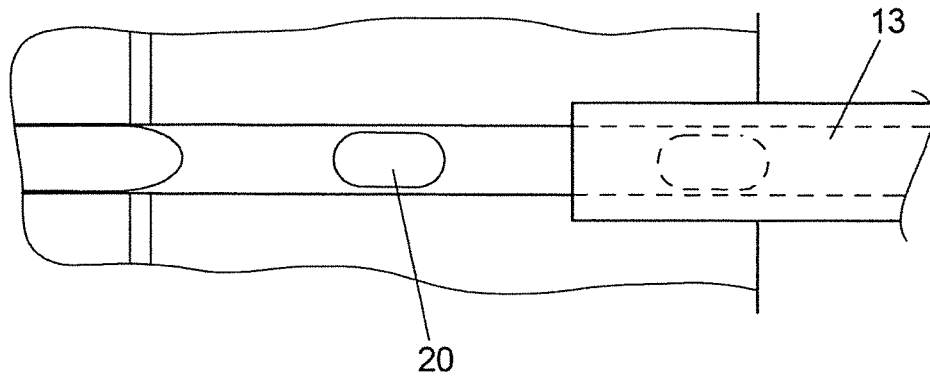


FIG 1B

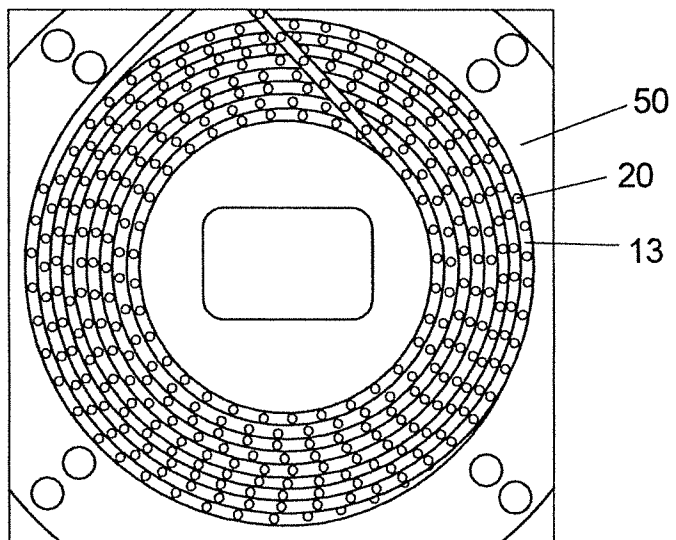


FIG 2A

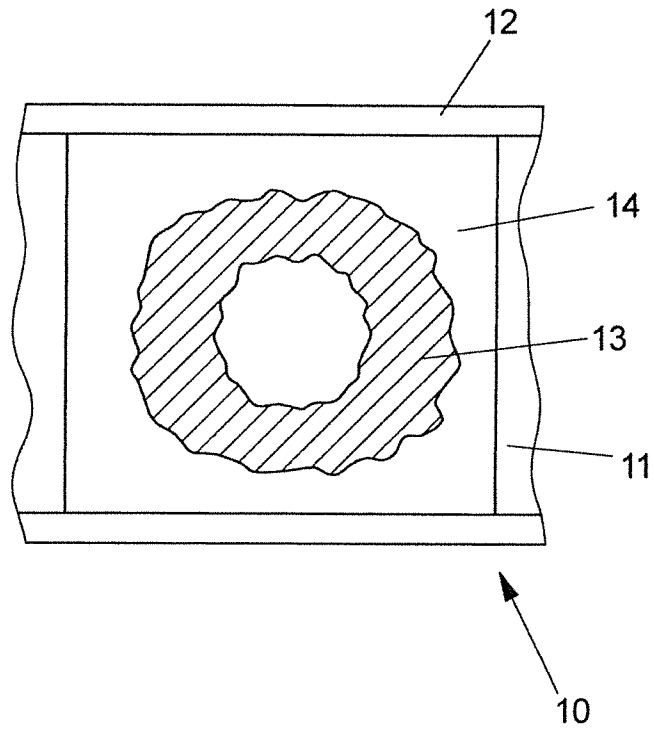


FIG 2B

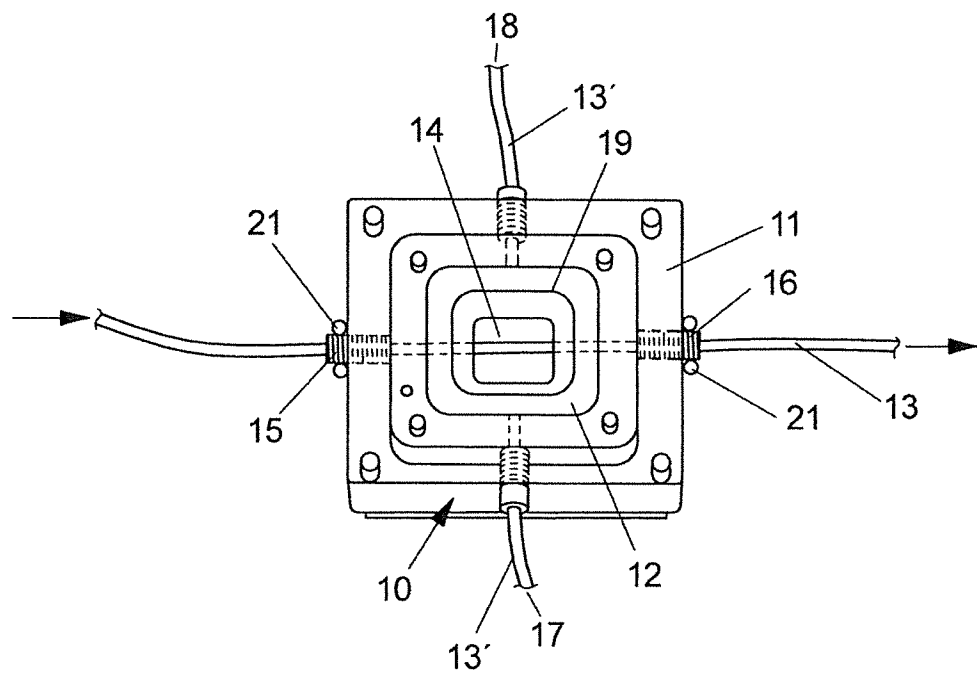


FIG 3A

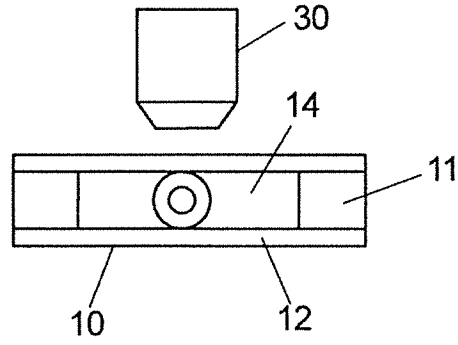


FIG 3B

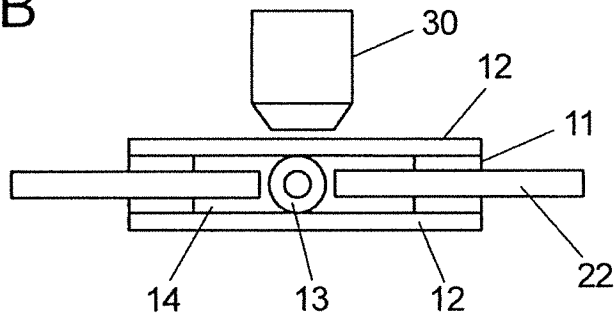


FIG 3C

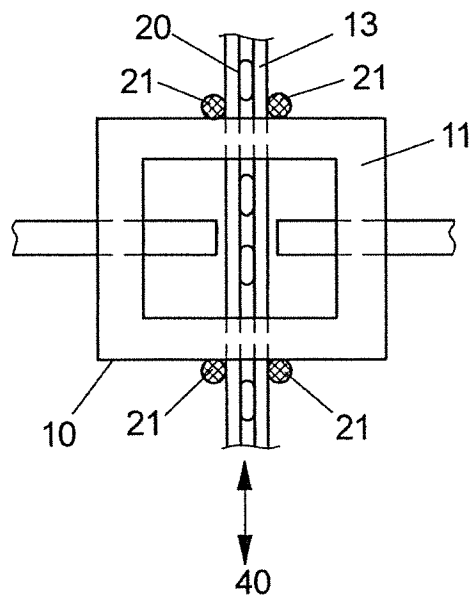


FIG 4A

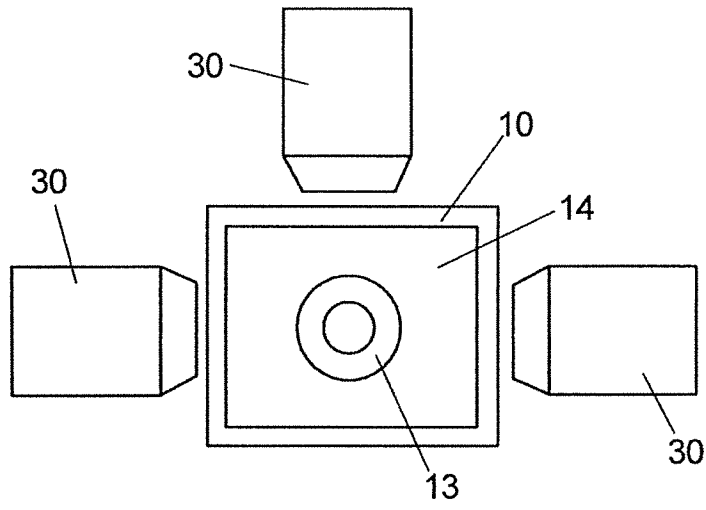


FIG 4B

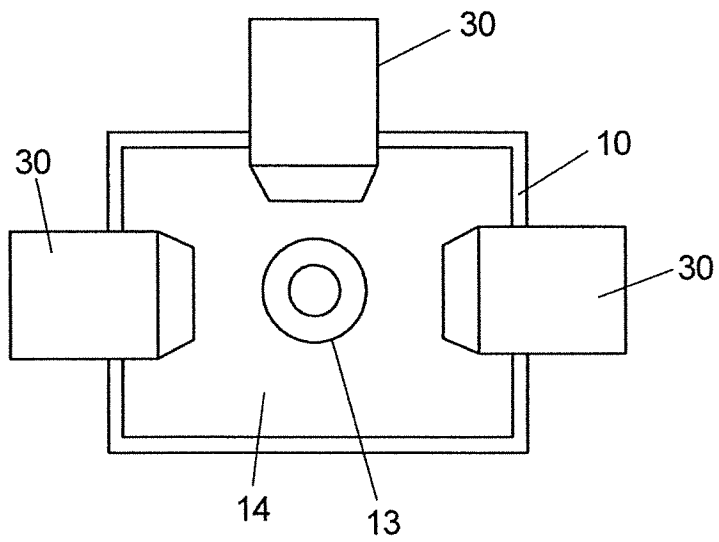


FIG 5A

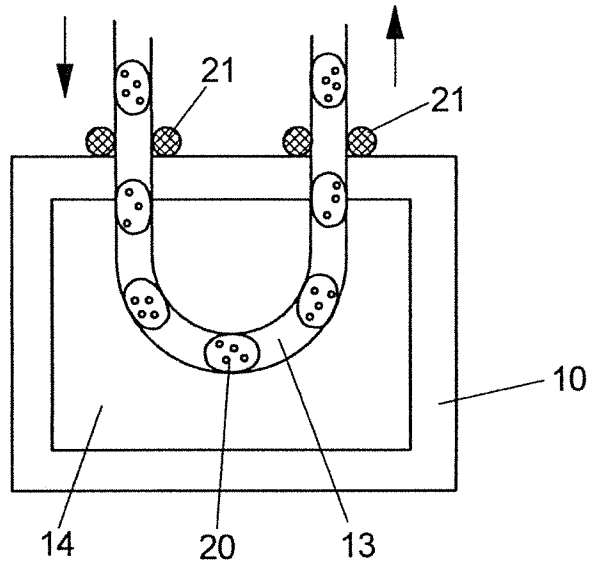


FIG 5B

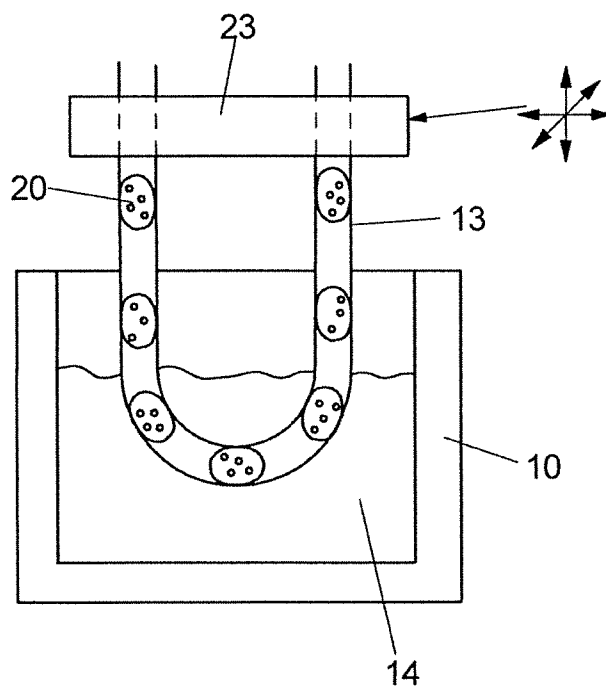


FIG 6A

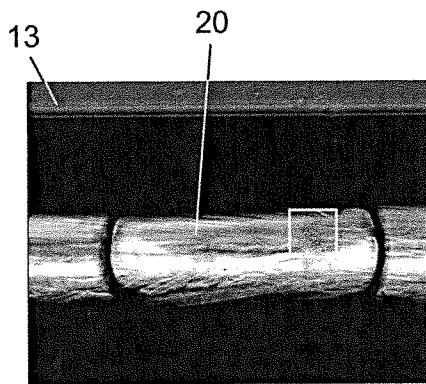


FIG 6B

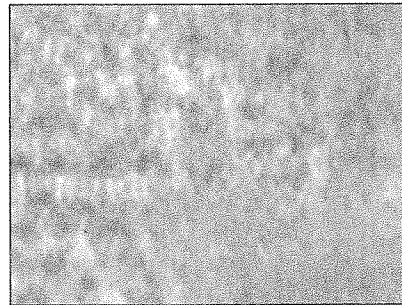


FIG 6C

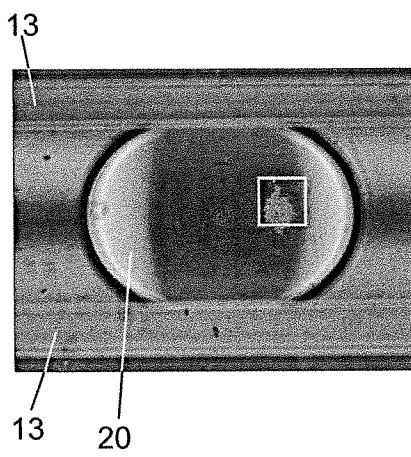


FIG 6D

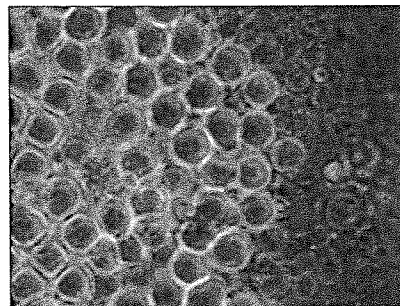


FIG 7A

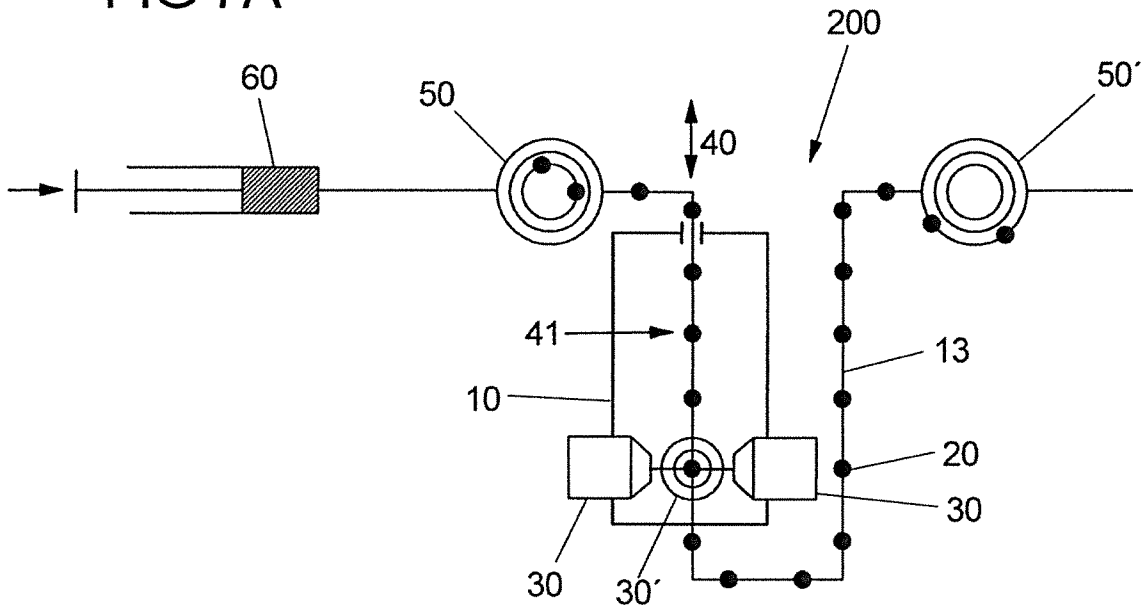


FIG 7B

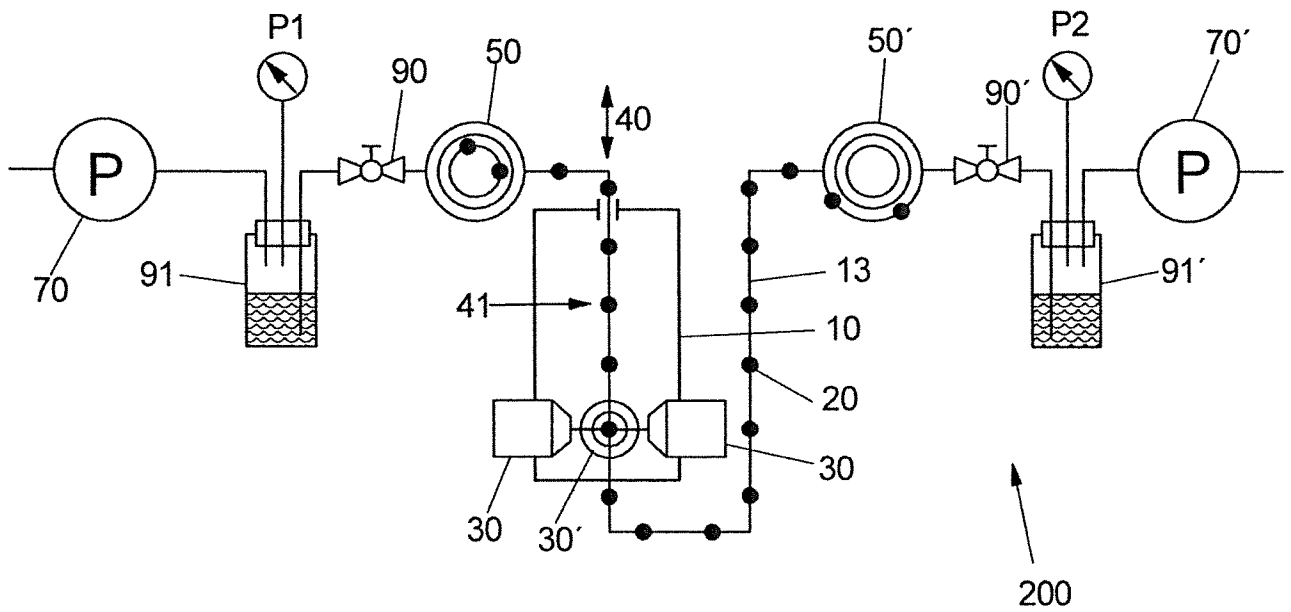


FIG 8A

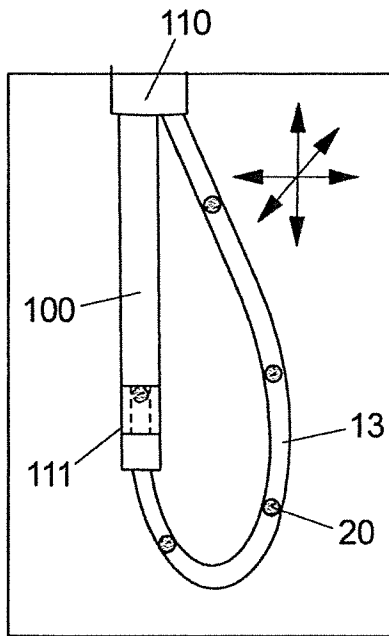


FIG 8B

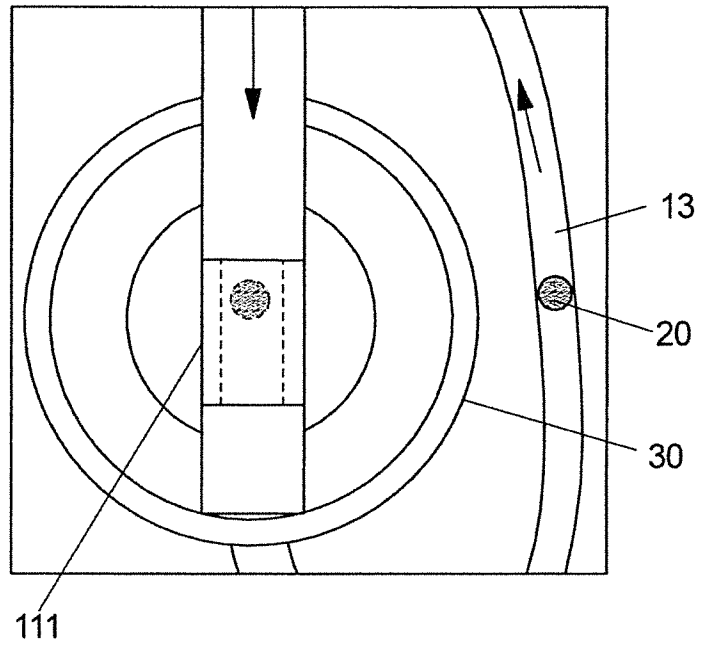


FIG 8C

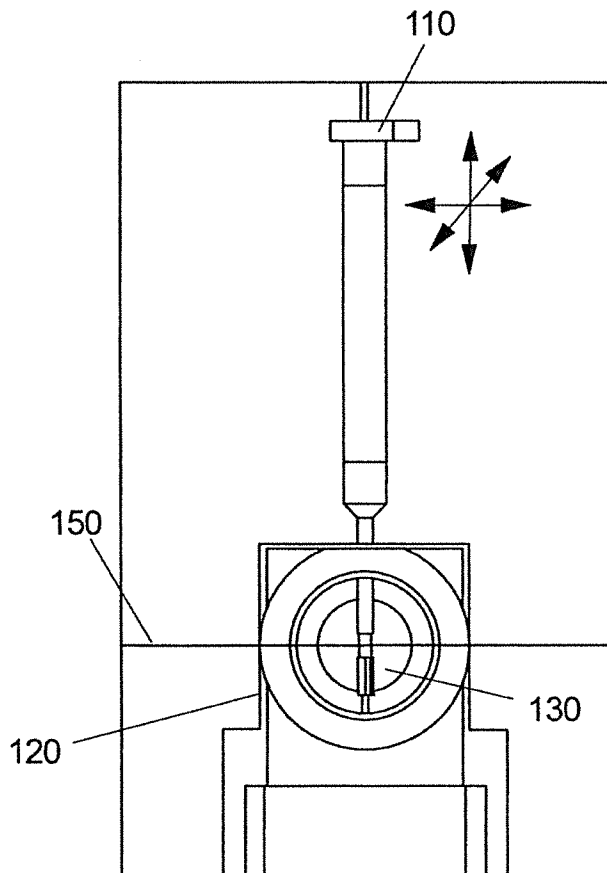


FIG 8D

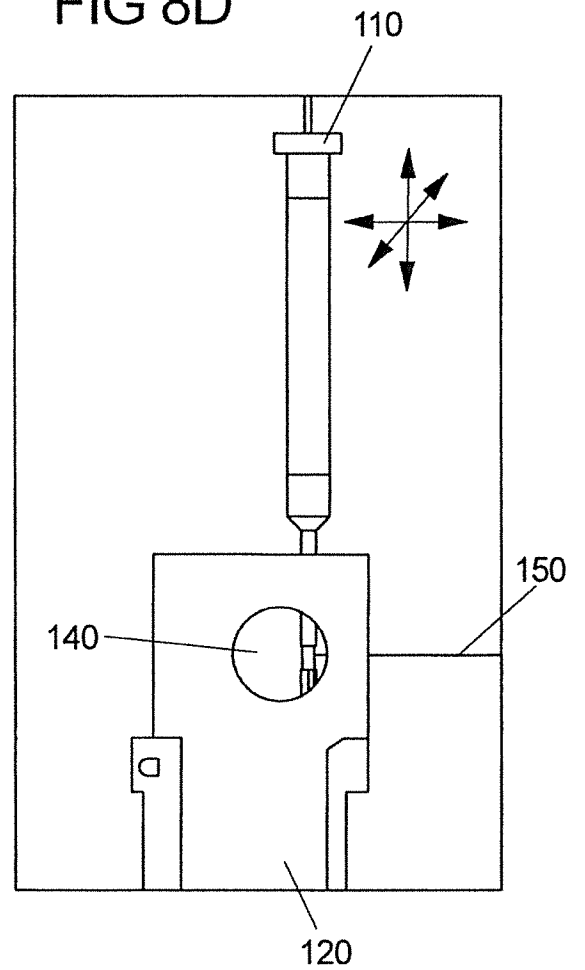


FIG 9

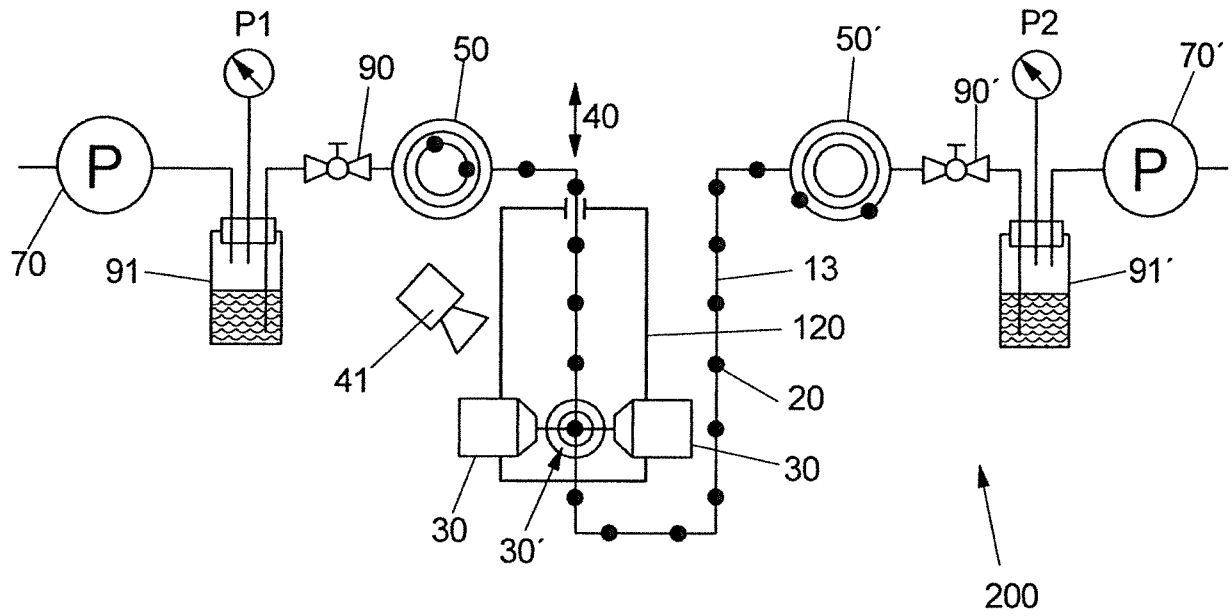


FIG 10

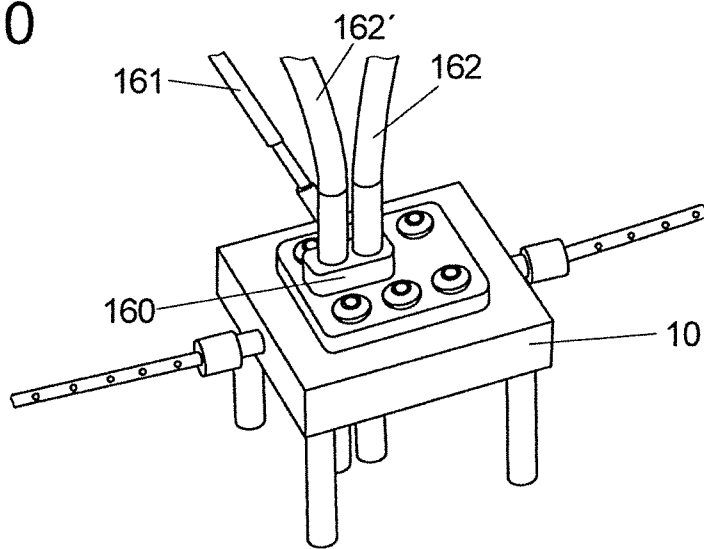


FIG 11

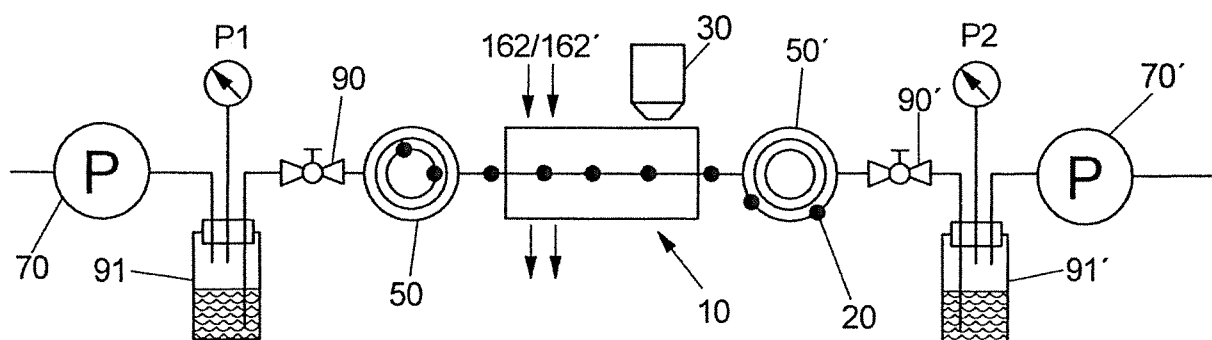


FIG 12A

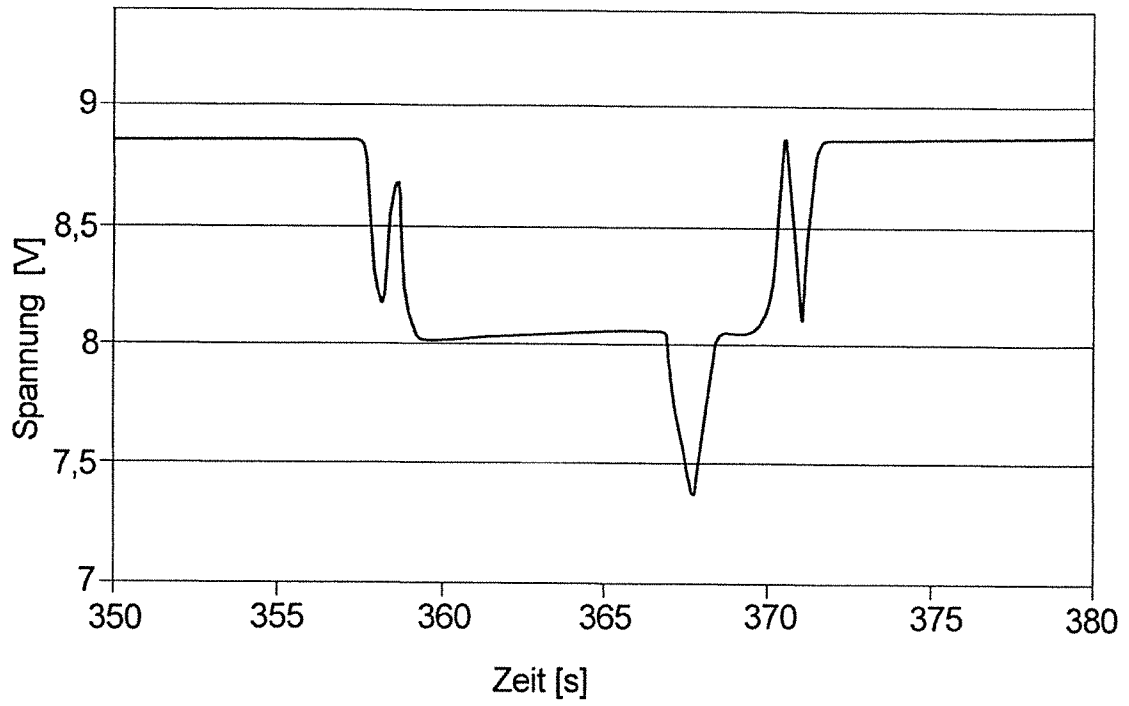
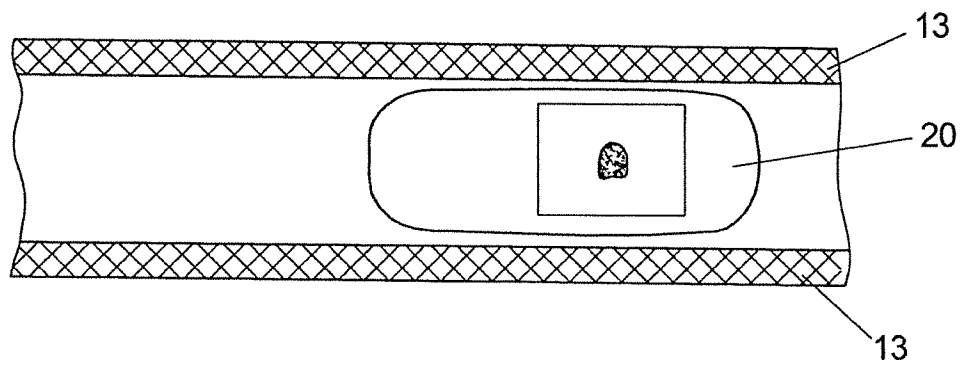


FIG 12B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/070640

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G02B 21/33</i> (2006.01)i; <i>G02B 21/34</i> (2006.01)i 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) G02B; 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, WPI Data, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 0476248 A1 (JAPAN SPECTROSCOPIC CO [JP]) 25 March 1992 (1992-03-25) page 1, line 43 - page 7, line 36; figures 1-11	1,2,5,6,8,9 4
Y	LEMKE KAREN ET AL. "A modular segmented-flow platform for 3D cell cultivation" <i>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i> , Vol. 205, 03 January 2015 (2015-01-03), pages 59-69 DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2014.11.040 ISSN: 0168-1656, XP029240254 page 60, column 1, paragraph 3 - page 68, column 1, paragraph 6; figures 1-12	1-3,7,8,11
Y	SPITKOVSKY ET AL. "Generation of Cardiomyocytes in Pipe-Based Microbioreactor Under Segmented Flow" <i>CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY</i> , Vol. 38, 09 May 2016 (2016-05-09), pages 1883-1896 XP002795202 page 1885, paragraph 2 - page 1887, paragraph 3	1,2,7,8
Y	JP H1039222 A (NIKON CORP) 13 February 1998 (1998-02-13) abstract; figures 1,2	1-4,7,8,10,11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 24 October 2019		Date of mailing of the international search report 08 November 2019
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Frisch, Anna Maria Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/070640

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 3118665 A1 (OLYMPUS CORP [JP]) 18 January 2017 (2017-01-18) paragraph [0032]; figures 1-24	1-3,7,8,11
Y	FAORO ET AL. "Aberration-corrected cryoimmersion light microscopy" <i>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE UNITED STATES OF AMERICA</i> , Vol. 115, 06 February 2018 (2018-02-06), pages 1204-1209 6, XP002795203 page 1205, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 6; figures 1-3	1-4,7,8,10,11
Y	TUNG ET AL. "Effects of index-mismatch-induced spherical aberration on two-photon imaging in skin and tissue-like constructs" <i>PROCEEDINGS OF THE SPIE</i> , Vol. 4963, 2003, pages 95-104 XP002795204 page 98, paragraph 4; figures 1-6	1-3,7,8,11
Y	P.A. YOUNG ET AL. "The effects of spherical aberration on multiphoton fluorescence excitation microscopy : EFFECTS OF SPHERICAL ABERRATION ON MPM" <i>JOURNAL OF MICROSCOPY</i> , GB, Vol. 242, No. 2, 11 October 2010 (2010-10-11), pages 157-165 DOI: 10.1111/j.1365-2818.2010.03449.x ISSN: 0022-2720, XP055495938 conclusions; figures 1-6	1-3,7,8,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/070640

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
EP	0476248	A1	25 March 1992	DE	69118468	D1	09 May 1996
				DE	69118468	T2	06 February 1997
				EP	0476248	A1	25 March 1992
				JP	H0663964	B2	22 August 1994
				JP	H04115140	A	16 April 1992
				US	5594545	A	14 January 1997
JP	H1039222	A	13 February 1998	NONE			
EP	3118665	A1	18 January 2017	EP	3118665	A1	18 January 2017
				JP	6552041	B2	31 July 2019
				JP	2017026665	A	02 February 2017
				US	2017017071	A1	19 January 2017

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2019/070640

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G02B21/33 G02B21/34
 ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G02B 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, WPI Data, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 476 248 A1 (JAPAN SPECTROSCOPIC CO [JP]) 25. März 1992 (1992-03-25)	1,2,5,6,8,9
Y	Seite 1, Zeile 43 - Seite 7, Zeile 36; Abbildungen 1-11	4
Y	----- LEMKE KAREN ET AL: "A modular segmented-flow platform for 3D cell cultivation", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 205, 3. Januar 2015 (2015-01-03), Seiten 59-69, XP029240254, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2014.11.040 Seite 60, Spalte 1, Absatz 3 - Seite 68, Spalte 1, Absatz 6; Abbildungen 1-12 ----- -/--	1-3,7,8,11



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
24. Oktober 2019	08/11/2019
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 Frisch, Anna Maria

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SPITKOVSKY ET AL.: "Generation of Cardiomyocytes in Pipe-Based Microbioreactor Under Segmented Flow", CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, Bd. 38, 9. Mai 2016 (2016-05-09), Seiten 1883-1896, XP002795202, Seite 1885, Absatz 2 - Seite 1887, Absatz 3 -----	1,2,7,8
Y	JP H10 39222 A (NIKON CORP) 13. Februar 1998 (1998-02-13) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 -----	1-4,7,8, 10,11
Y	EP 3 118 665 A1 (OLYMPUS CORP [JP]) 18. Januar 2017 (2017-01-18) Absatz [0032]; Abbildungen 1-24 -----	1-3,7,8, 11
Y	FAORO ET AL.: "Aberration-corrected cryoimmersion light microscopy", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Bd. 115, 6, 6. Februar 2018 (2018-02-06), Seiten 1204-1209, XP002795203, Seite 1205, Spalte 1, Absatz 2 - Spalte 2, Absatz 6; Abbildungen 1-3 -----	1-4,7,8, 10,11
Y	TUNG ET AL.: "Effects of index-mismatch-induced spherical aberration on two-photon imaging in skin and tissue-like constructs", PROCEEDINGS OF THE SPIE, Bd. 4963, 2003, Seiten 95-104, XP002795204, Seite 98, Absatz 4; Abbildungen 1-6 -----	1-3,7,8, 11
Y	P.A. YOUNG ET AL: "The effects of spherical aberration on multiphoton fluorescence excitation microscopy : EFFECTS OF SPHERICAL ABERRATION ON MPM", JOURNAL OF MICROSCOPY, Bd. 242, Nr. 2, 11. Oktober 2010 (2010-10-11), Seiten 157-165, XP55495938, GB ISSN: 0022-2720, DOI: 10.1111/j.1365-2818.2010.03449.x conclusions; Abbildungen 1-6 -----	1-3,7,8, 11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2019/070640

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0476248	A1	25-03-1992	DE 69118468 D1 09-05-1996
			DE 69118468 T2 06-02-1997
			EP 0476248 A1 25-03-1992
			JP H0663964 B2 22-08-1994
			JP H04115140 A 16-04-1992
			US 5594545 A 14-01-1997

JP H1039222	A	13-02-1998	KEINE

EP 3118665	A1	18-01-2017	EP 3118665 A1 18-01-2017
			JP 6552041 B2 31-07-2019
			JP 2017026665 A 02-02-2017
			US 2017017071 A1 19-01-2017
