

(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
8. Januar 2009 (08.01.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/003948 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C09K 11/06 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/058287
- (22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juni 2008 (27.06.2008)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2007 030 403.1 29. Juni 2007 (29.06.2007) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): UNIVERSITÄT BIELEFELD [DE/DE]; Universitätsstrasse 25, 33615 Bielefeld (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TINNEFELD, Philip [DE/DE]; Am Vorwerk 2, 33611 Bielefeld (DE). SAUER, Markus [DE/DE]; Hedwig-Jochmus-Str. 12, 69124 Heidelberg (DE).
- (74) Anwalt: MICHALSKI HÜTTERMANN & PARTNER PATENTANWÄLTE; Sonja Althausen, Zusammenschluss-Nr. 289, Neuer Zollhof 2, 40221 Düsseldorf (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PROCESS FOR IMPROVING THE PHOTOSTABILITY AND/OR CONTROL OF THE FLUORESCENCE INTENSITY OF FLUORESCENT DYES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VERBESSERUNG DER PHOTOSTABILITÄT UND/ODER KONTROLLE DER FLUORESCENZINTENSITÄT VON FLUORESCENZFARBSTOFFEN

Fig. 1a

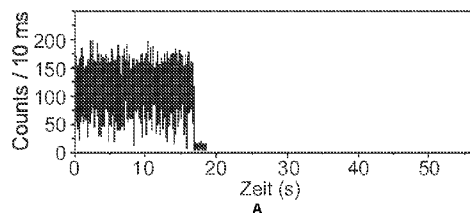


Fig. 1b

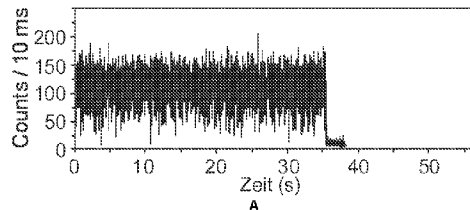
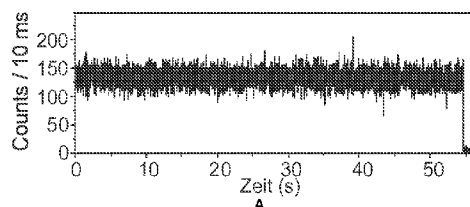


Fig. 1c



A ... Time (s)

(57) Abstract: The present invention relates to a process for improving the photostability and/or control of the fluorescence intensity of a fluorescent dye wherein a fluorescent dye is admixed with a redox buffer comprising at least one reducing agent and/or at least one oxidizing agent and/or at least one reducing-oxidizing agent, and also to a fluorescent dye composition comprising a fluorescent dye and a redox buffer comprising at least one reducing agent and at least one oxidizing agent or at least one reducing-oxidizing agent.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Photostabilität und/oder Kontrolle der Fluoreszenzintensität eines Fluoreszenzfarbstoffs, wobei man einem Fluoreszenzfarbstoff einen Redox-Puffer umfassend wenigstens ein Reduktionsmittel und/oder wenigstens ein Oxidationsmittel und/oder wenigstens ein Reduktions-Oxidations-Mittel zusetzt, sowie Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzung enthaltend einen Fluoreszenzfarbstoff und einen Redox-Puffer umfassend wenigstens ein Reduktionsmittel und wenigstens ein Oxidationsmittel oder wenigstens ein Reduktions-Oxidations-Mittel.

WO 2009/003948 A3



PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

26. Februar 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/058287

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. WIDENGREN, ET. AL.: "Strategies to Improve Photostabilities in Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A, vol. 111, 29 December 2006 (2006-12-29), pages 429-440, XP002505790 ACS	1,3-11, 14,15
A	abstract page 430 (left column, last paragraph) - page 430 (right column, first paragraph) 2. Experimental Setup 6. Concluding Remarks	2,12,13
X	P. S. DITTRICH, ET. AL.: "Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation" APPLIED PHYSICS B, vol. 73, 2001, pages 829-837, XP002505792 AIP	1,3-11, 14,15
A	abstract 3 Materials and methods	2,12,13
A	M. HEILEMANN, ET. AL.: "Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single Molecule Optical Switch" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 127, 22 February 2005 (2005-02-22), pages 3801-3806, XP002505791 ACS abstract Materials and Methods	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2008/058287

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: **1-15 (in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See additional sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box II.2**Claims 1-15 (in part)****1. Independent claim 14**

Claim 14 relates to an extremely large number of possible fluorescent dye compositions. Support and disclosure (PCT Articles 6 and 5), however, can only be found for a very small proportion of the claimed products, see the examples 1 to 4 on pages 42-49. The reason is as follows:

The definition in the independent claim 14 yields the following combinations of fluorescent dye compositions:

- a) fluorescent dye + reducing agent,**
- b) fluorescent dye + oxidizing agent,**
- c) fluorescent dye + reducing agent + oxidizing agent,**
- d) fluorescent dye + reducing-oxidizing agent,**
- e) fluorescent dye + reducing agent + reducing-oxidizing agent,**
- f) fluorescent dye + oxidizing agent + reducing-oxidizing agent,**
- g) fluorescent dye + reducing agent + oxidizing agent + reducing-oxidizing agent,**

None of the components of the compositions a) to g) is defined in more detail in claim 14. Accordingly, there is an extremely large number of possible fluorescent dye compositions. It does not follow plausibly from the description that all these possible fluorescent dye compositions can actually solve the underlying problem of this application, i.e. to provide means for improving the photostability and/or the control of the fluorescence intensity (see description, page 3, third paragraph).

Even if the definitions of the components were restricted in the way they were defined in the method claims 3 (oxidizing agent), 4 (reducing agent) and 8 (fluorescent dyes), a very large number of fluorescent dye compositions would still be claimed. Even in this case, it does not follow plausibly from the description that the oxidizing agents, reducing agents and fluorescent dyes, which are structurally very different from one another as defined in the claims 3, 4 and 8, show such a behaviour that they solve the underlying problem. A person skilled in the art would have to make an unreasonably big effort in order to determine in the entire claimed field which of the fluorescent dye compositions could actually solve the underlying problem.

In the examples 1-4, only fluorescent dye compositions of the types a), b) and c) were used. Furthermore, only the oxidizing agent methyl viologen, the reducing agent Trolox and the fluorescent dyes cyanin Cy5 or carborhodamine were used. It was proven using exclusively these few compositions that the underlying problem was solved. For these reasons, the failure to meet the relevant requirements is so serious that it was taken into consideration in determining the scope of protection (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search with respect to claim 14 was restricted to those claimed fluorescent dye compositions which are supported by the examples 1 to 4 of the description, and to a generalization of their structural formulae, i.e. structurally similar reducing agents and oxidizing agents. The precise subject matter of the search with respect to claim 14 was defined as follows: The subject matter of claim 14 with the following restrictions: Fluorescent dye composition containing a fluorescent dye and a redox buffer comprising at least one reducing agent and/or at least one oxidizing agent, the oxidizing agent being selected from the bipyridinium salts, the reducing agent being selected from 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) and ascorbic acid and the fluorescent dye being selected from the list defined in claim 8.

2. Independent claims 1 (method), 10 (use), 11 (use), 12 (product), 15 (product)

The subject matter of the search of these claims was also restricted due to the reasons mentioned under point 1. The restriction was imposed in the same way as for claim 14 defined under point 1.

3. Dependent claims

The restriction of the search of the dependent claims results necessarily from the restriction of the search of the independent claims.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies in cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. However, after entry into the regional phase before the EPO an additional search may be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been corrected.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/058287

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C09K11/06 G01N21/64

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole.)
C09K G01N C12Q

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	J. VOGELSSANG, ET. AL.: "A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes" ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, Bd. 47, 2008, Seiten 5465-5469, XP002505788 Wiley-VCH das ganze Dokument	1-15
X	I. RASNIK, ET. AL.: "Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging" NATURE METHODS, Bd. 3, 2006, Seiten 891-893, XP002505789 Nature Publishing Group das ganze Dokument	1,3-11, 14,15
A		2,12,13

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* älteres Dokument, 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 anderen 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	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
27. November 2008	10/12/2008

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 Heer, Stephan
--	--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/058287

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. WIDENGREN, ET. AL.: "Strategies to Improve Photostabilities in Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A, Bd. 111, 29. Dezember 2006 (2006-12-29), Seiten 429-440, XP002505790 ACS	1,3-11, 14,15
A	Zusammenfassung page 430 (left column, last paragraph) - page 430 (right column, first paragraph) 2. Experimental Setup 6. Concluding Remarks	2,12,13
X	P. S. DITTRICH, ET. AL.: "Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation" APPLIED PHYSICS B, Bd. 73, 2001, Seiten 829-837, XP002505792 AIP	1,3-11, 14,15
A	Zusammenfassung 3 MAterials and methods	2,12,13
A	M. HEILEMANN, ET. AL.: "Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single Molecule Optical Switch" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 127, 22. Februar 2005 (2005-02-22), Seiten 3801-3806, XP002505791 ACS Zusammenfassung Materials and Methods	1-15

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr. 1-15 (Teile)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.2

Ansprüche Nr.: 1-15 (Teile)

1. Unabhängiger Anspruch 14

Der Anspruch 14 bezieht sich auf eine extrem große Anzahl von möglichen Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzungen. Stützung und Offenbarung im Sinne von Artikel 6 und 5 PCT kann jedoch nur für einen sehr kleinen Teil der beanspruchten Produkte gefunden werden, siehe Beispiele 1-4 auf den Seiten 42-49. Die Begründung ist die folgende:

Die Definition im unabhängigen Anspruch 14 läßt folgende Kombinationen von Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzungen zu:

- a) Fluoreszenzfarbstoff + Reduktionsmittel
- b) Fluoreszenzfarbstoff + Oxidationsmittel
- c) Fluoreszenzfarbstoff + Reduktionsmittel + Oxidationsmittel
- d) Fluoreszenzfarbstoff + Reduktions-Oxidationsmittel
- e) Fluoreszenzfarbstoff + Reduktionsmittel + Reduktions-Oxidationsmittel
- f) Fluoreszenzfarbstoff + Oxidationsmittel + Reduktions-Oxidationsmittel
- g) Fluoreszenzfarbstoff + Reduktionsmittel + Oxidationsmittel + Reduktions-Oxidationsmittel

Keine der Komponenten dieser Zusammensetzungen a) bis g) ist in Anspruch 14 genauer definiert. Entsprechend gibt es eine enorm grosse Anzahl von möglichen Farbstoffzusammensetzungen. Es geht aus der Beschreibung nicht glaubhaft hervor, daß all diese möglichen Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzungen das der Anmeldung zugrundeliegende Problem, i.e. Mittel zur Verbesserung der Photostabilität und/oder der Kontrolle der Fluoreszenzintensität (Beschreibung 3 (3. Absatz)), auch tatsächlich lösen können.

Selbst, wenn die Definition der Komponenten derart eingeschränkt werden wie sie in den Verfahrensansprüchen 3 (Oxidationsmittel), 4 (Reduktionsmittel) und 8 (Fluoreszenzfarbstoffe) definiert wurden würden immer noch eine sehr grosse Anzahl von Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzungen beansprucht. Auch in einer solchen Situation geht aus der Beschreibung nicht glaubhaft hervor, daß sich die in den Ansprüchen 3, 4 und 8 definierten strukturell sehr unterschiedlichen Oxidationsmittel, Reduktionsmittel und Fluoreszenzfarbstoffe in Zusammensetzungen auch derart verhalten, daß sie das zugrundeliegende Problem lösen. Der Fachmann müßte einen unzumutbar grossen Aufwand betreiben um im gesamten beanspruchten Bereich herauszufinden welche der Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzung das zugrundeliegende Problem tatsächlich lösen.

In den Beispielen 1-4 wurden lediglich Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzungen der Typen a), b) und c) eingesetzt. Zudem wurde ausschließlich das Oxidationsmittel Methylviologen, das Reduktionsmittel Trolox und die Fluoreszenzfarbstoffe Cyanin Cy5 oder Carborhodamin eingesetzt. Nur mit diesen wenigen Zusammensetzungen wurde nachgewiesen, daß das zugrunde liegende Problem tatsächlich gelöst wurde.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Aus diesen Gründen ist die Verletzung der einschlägigen Erfordernisse so schwerwiegend, daß sie bei der Bestimmung des Recherchenumfangs berücksichtigt wurde (PCT Richtlinien 9.19 und 9.23).

Die Recherche von Anspruch 14 wurde auf jene beanspruchten Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzungen beschränkt, die durch die Beispiele 1-4 der Beschreibung gestützt sind, und eine Verallgemeinerung ihrer strukturellen Formeln, i.e. strukturell ähnliche Reduktionsmittel und Oxidationsmittel. Der genaue Gegenstand der Recherche von Anspruch 14 wurde wie folgt definiert:

Gegenstand des Anspruchs 14 mit folgenden Einschränkungen:

Fluoreszenzfarbstoff-Zusammensetzung enthaltend einen Fluoreszenzfarbstoff und einen Redox-Puffer umfassend wenigstens ein Reduktionsmittel und/oder wenigstens ein Oxidationsmittel, wobei das Oxidationsmittel ausgewählt wird aus den Bipyridinium Salzen, das Reduktionsmittel ausgewählt wird aus 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) und Ascorbinsäure und der Fluoreszenzfarbstoff ausgewählt wird aus der in Anspruch 8 definierten Liste.

2. Unabhängige Ansprüche 1 (Verfahren), 10 (Verwendung), 11 (Verwendung), 12 (Produkt), 15 (Produkt)

Der Gegenstand der Recherche dieser Ansprüche wurde aus den unter Punkt 1 genannten Gründen ebenfalls eingeschränkt. Die Einschränkung erfolgte in der selben Weise wie für den Anspruch 14 unter Punkt 1 definiert.

3. Abhängige Ansprüche

Die Einschränkung der Recherche der abhängigen Ansprüche ergibt sich zwingend aus der Einschränkung der Recherche der unabhängigen Ansprüche.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8:2), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäß Art. 17 (2) PCT geführt haben.