



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 647**

51 Int. Cl.:
G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03794917 .9**

86 Fecha de presentación : **21.08.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1532447**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Creación de quimiolumiscencia mediante hidrógeno.**

30 Prioridad: **26.08.2002 DE 102 39 098**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Giesen, Ursula;**
Heinze, Jürgen y
Borgwarth, Kai

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 300 647 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Creación de quimioluminiscencia mediante hidrógeno.

5 La presente invención se refiere a una procedimiento para la creación de quimioluminiscencia, el cual comprende la preparación de una especie quimioluminiscente mediante hidrógeno naciente. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para la detección de un analito en una muestra mediante el empleo de un complejo metálico luminescente como grupo de marcado y un dispositivo apropiado para ello.

10 Los complejos metálicos luminescentes son ya conocidos en el estado actual de la técnica. La patente EP-A-0 178 450 da a conocer complejos de rutenio que están copulados con un material activo inmunológico, en el cual el complejo de rutenio contiene tres ligandos iguales o diferentes, bi o policíclicos con por lo menos dos heterociclos que contienen nitrógeno, en donde por lo menos uno de estos ligandos está substituido con por lo menos un grupo hidrosolubilizante, como el SO_3H ó el $-\text{COOH}$ y en donde por lo menos uno de estos ligandos está substituido por
15 lo menos con un grupo reactivo como directamente con el $-\text{COOH}$, ó mediante un grupo espaciador, y en donde los ligandos están unidos al rutenio mediante átomos de nitrógeno.

Se conoce además el empleo de complejos metálicos luminescentes como reactivos de marcado para un procedimiento de detección electroquimioluminiscente (ver p. ej., las patentes EP-A-0 580 979, WO 87/06706, US 5.238.108 ó US 5.310.687). Dicho procedimiento de detección electroquímio-luminescente se basa en que en un dispositivo de medición adecuado, el átomo central del complejo metálico, p. ej., el rutenio, se transforma mediante una transferencia de electrones en el estado de triplete de MLCT excitado. A partir de este estado excitado, puede relajarse con la emisión de un fotón mediante un paso triplete-singulete prohibido, al estado original (ver p. ej., la patente WO/90 05296, Leland y Powell, J. Electrochem. Soc. 137 (1990), 3127-3131; Blackburn *et al.*, Clin. Chem. 37 (1991), 1534-1539).
25

El mecanismo de reacción descrito en la literatura para la producción de quimioluminiscencia, comprende la oxidación de un mediador, como la tripropilamina, en un radical catión. Este radical catión se transforma mediante la pérdida de un protón en un radical TPA. El radical TPA es de nuevo aquella molécula la cual mediante otro traspaso de electrones se transforma en un complejo metálico oxidado, p. ej., un complejo de Ru^{3+} en estado de triplete-MLCT- Ru^{2+} , el cual está en posición de emitir un fotón.
30

Con el mecanismo descrito no se pueden explicar sin embargo, algunos resultados experimentales. Así, se ha descubierto solamente el 40-50% de la corriente teórica. Además, la creación de electroquimioluminiscencia es, en gran medida, función del material de los electrodos, lo cual en virtud de la función de los electrodos como elemento de oxidación del TPA y del complejo metálico, no debería ser propiamente el caso. Además, hasta ahora no han sido detectados tampoco ningunos dímeros TPA, los cuales, en caso de que se formen radicales TPA según el mecanismo anterior, deben formarse en solución.
35

La patente US 6.432.722 describe un procedimiento para la detección de un analito en una muestra mediante medición de la electroquimioluminiscencia. Para ello, se excita en un estado capaz de luminiscencia, un complejo metálico mediante un mediador, el cual suele ser de preferencia una amina terciaria. La patente US 6.271.041 describe igualmente la excitación de la quimioluminiscencia de un complejo metálico mediante una amina. En ambos documentos el empleo de un mediador es un elemento esencial para la formación de una especie capaz de quimioluminiscencia. Otras posibilidades para la creación de una forma de complejo metálico capaz de quimioluminiscencia no se mencionan.
40 45

Por este motivo se efectuaron otras investigaciones para la creación de quimioluminiscencia en complejos metálicos. A este respecto, se descubrió sorprendentemente que un complejo de rutenio en presencia de hidrógeno naciente, p. ej., obtenido mediante litio/butanol/ H_2SO_4 produce quimioluminiscencia con un gran rendimiento.
50

En base a estos nuevos conocimientos se puede preparar un nuevo procedimiento para la producción de quimioluminiscencia con un complejo metálico como generador de luminiscencia, el cual procedimiento comprende el empleo de hidrógeno naciente para la reducción del complejo metálico oxidado en estado excitado capaz de quimioluminiscencia. Este procedimiento puede emplearse en particular para la detección de analitos en una muestra, en donde frente a los procedimientos utilizados hasta ahora puede obtenerse un mejor rendimiento en quimioluminiscencia o/y una menor propensión a las perturbaciones.
55

Un primer aspecto de la invención es un procedimiento para la creación de quimioluminiscencia con un complejo metálico luminescente como generador de luminiscencia, el cual comprende la oxidación del complejo metálico y la reducción del complejo metálico mediante hidrógeno naciente, con lo cual aparece una forma del complejo metálico capaz de quimioluminiscencia.
60

En particular se refiere la invención a un procedimiento para la detección de un analito en una muestra mediante el empleo de un complejo metálico luminescente como grupo marcador, en el cual la luminiscencia del complejo metálico se produce mediante los siguientes pasos:
65

- (i) oxidación del complejo metálico, y

ES 2 300 647 T3

(ii) reducción del complejo metálico mediante hidrógeno naciente, en donde aparece una forma del complejo metálico capaz de quimioluminiscencia, y

(iii) Determinación del analito mediante la quimioluminiscencia.

Otro aspecto de la invención es un dispositivo para la producción de quimioluminiscencia mediante el empleo de un complejo metálico luminiscente como generador de luminiscencia, el cual comprende:

(i) un medio para la oxidación del complejo metálico, y

(ii) un medio para la producción de hidrógeno naciente,

en donde los medios (i) e (ii) comprenden dos cámaras de reacción separadas.

En particular, ese dispositivo está previsto para la detección de un analito en una muestra mediante el empleo de un complejo metálico luminiscente como grupo marcador, el cual comprende:

(i) un medio para la oxidación del complejo metálico,

(ii) un medio para la producción de hidrógeno naciente, y

(iii) un medio para la detección por luminiscencia,

en donde los medios (i) e (ii) comprenden dos cámaras de reacción por separado.

Con particular preferencia, el procedimiento sirve para aplicaciones en el campo del diagnóstico, es decir, para la detección de un analito en una muestra. Por ejemplo, el procedimiento puede emplearse para la detección de parámetros físicos, químicos o bioquímicos en una muestra, p. ej., en un líquido corporal, una muestra de tejido, etc., o una muestra del ambiente.

La detección de un analito comprende la puesta en contacto de una muestra con un reactivo de detección el cual como grupo marcador lleva un complejo metálico luminiscente. La muestra es de preferencia una muestra biológica y está en forma líquida. Puede proceder de tejidos humanos, animales o vegetales, líquidos corporales, cultivos celulares procarióticos o eucarióticos, etc.

El reactivo de detección comprende un complejo metálico luminiscente como grupo marcador, el cual de preferencia está copulado con una sustancia biológica, p. ej., biotina, ácidos nucleicos, p. ej., oligonucleótidos, ADN ó ARN, análogos de ácidos nucleicos, como por ejemplo ácidos nucleicos peptídicos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, antígenos de péptido o de polipéptido, es decir, polipéptidos reactivos inmunológicos o haptenos, es decir, moléculas orgánicas con un peso molecular de 150 a 2000, así como eventualmente otros reactivos, ya conocidos por el experto.

La realización del procedimiento de detección según la invención, comprende de preferencia una incubación de la muestra con el reactivo de detección, para provocar una reacción directa o indirecta del reactivo de detección con el analito contenido en la muestra. La presencia de un analito o respectivamente la cantidad del mismo en la muestra, se determina cualitativa y/o cuantitativamente en base a la señal de quimioluminiscencia procedente del grupo marcador.

El procedimiento puede efectuarse como un ensayo homogéneo, es decir, efectuando la medición de la quimioluminiscencia en fase líquida. De preferencia, sin embargo, se efectúa un ensayo heterogéneo en el cual el marcador de quimioluminiscencia está inmovilizado en una fase sólida, p. ej., una fase sólida en partículas como por ejemplo microperlas magnéticas, p. ej., microperlas recubiertas con una capa de estreptavidina, o partículas coloidales. En la realización de un ensayo heterogéneo, el procedimiento según la invención puede comprender los pasos llamados paso de captación y paso de lavado, en los cuales el marcador está inmovilizado sobre la fase sólida y se consigue una separación del resto de componentes de la muestra.

Una característica preferida del procedimiento según la invención es el empleo de complejos metálicos quimioluminiscentes, los cuales tienen una estructura de fórmula general (I):



en donde

M es un catión metálico di o trivalente escogido entre los cationes de metales de las tierras raras o de metales de transición,

L₁, L₂ y L₃ son iguales o diferentes, y significan ligandos con por lo menos dos heterociclos que contienen nitrógeno, en donde L₁, L₂, y L₃ están unidos al catión de metal mediante átomos de nitrógeno,

ES 2 300 647 T3

Y significa un engarce unido a uno de los ligandos, mediante el cual el complejo, p. ej., (a) está copulado a una sustancia biológica, ó (b) puede ser copulado a una sustancia biológica,

m es un número entero de 1 a 10, de preferencia 1 a 4 y con particular preferencia es 1, y

n es un número entero de 1 a 6, de preferencia 1 a 3 y con particular preferencia es 1.

El catión metálico en este complejo es de preferencia rutenio, osmio, renio, iridio, rodio, platino, indio, paladio, molibdeno, tecnecio, cobre, cromo, wolframio, itrio o lutecio. Son particularmente preferidos el rutenio, iridio, renio, cromo y osmio. El más preferido es el rutenio. Para equilibrar la carga, el complejo puede contener eventualmente iones opuestos, p. ej., aniones.

Los ligandos L_1 , L_2 , y L_3 son de preferencia, ligandos con por lo menos 2 heterociclos que contienen nitrógeno. Se prefieren los heterociclos aromáticos como p. ej., biperidilo, pipiracilo, terpiridilo y fenantronilo. Particularmente preferidos son los ligandos escogidos de sistemas anulares de biperidina y fenantrolina.

En los complejos metálicos según la invención se encuentran de preferencia, grupos hidrófilos o/y portadores de carga, los cuales por ejemplo están unidos covalentemente p. ej., al engarce o a otros substituyentes de los ligandos L_1 , L_2 , y L_3 . Esta clase de complejos metálicos hidrófilos o cargados son dados a conocer p. ej., en las patentes WO 96/03409 y WO 96/03410. El concepto "portadores de carga" significa, en el sentido de la presente invención, un grupo que con un valor del pH en un margen de 6 a 8, está en su mayor parte en forma iónica. El complejo contiene de preferencia hasta 10, con particular preferencia de 2 a 8, de dichos portadores de carga.

Con particular preferencia, el complejo contiene por lo menos un portador de carga negativa. Por ejemplo, para portadores de carga negativa apropiados, son adecuados los grupos fosfato, fosfonato, sulfonato y carboxilato, de los cuales los grupos sulfonato y carboxilato son los más preferidos.

Además, son apropiados para el procedimiento según la invención, los complejos que contienen un grupo hidrófilo. Ejemplos de grupos hidrófilo apropiados son las unidades alquilenoxilo de 2 a 3 átomos de carbono, unidades alquilentio de 2 a 3 átomos de carbono, y las unidades polihidroxilo.

La obtención de dichos complejos metálicos puede efectuarse según métodos ya conocidos, por ejemplo mediante reacción de una sal metálica p. ej., de un haluro metálico y eventualmente el consiguiente intercambio del ión halógeno por grupos hexafluorofosfato, trifluoroacetato o tetrafluorborato. Estos tipos de procedimiento son ya conocidos. El complejo metálico se emplea para el procedimiento según la invención habitualmente en forma de conjugados con una sustancia biológica de manera que a la sustancia biológica está copulado por lo menos un complejo metálico. Ejemplos de sustancias biológicas apropiadas son células, virus, partículas subcelulares, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, oligo-sacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias activas farmacológicas, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos y azúcares.

La copulación del complejo metálico con la sustancia biológica se efectúa de preferencia mediante un grupo funcional reactivo o activable en el complejo metálico, p. ej., un haluro de ácido carboxílico, un anhídrido de ácido carboxílico o un éster activo, como por ejemplo un éster N-hidroxi-succinimida, o una maleimida, que con un grupo funcional de la sustancia biológica puede copularse covalentemente. Cuando el grupo funcional es un anhídrido de ácido carboxílico, haluro de ácido carboxílico o un éster activo, puede tener lugar por ejemplo una copulación con grupos amino libres de la sustancia biológica. Cuando el grupo funcional es un radical maleimida, puede tener lugar una copulación con grupos -SH libres de la sustancia biológica. De manera análoga puede tener lugar también una activación de grupos funcionales de la sustancia biológica, la cual puede reaccionar a continuación con una función ácido carboxílico, amino o tiol del complejo metálico, libre.

El procedimiento según la invención comprende los pasos (i) oxidación del complejo metálico y (ii) reducción del complejo metálico. La oxidación del átomo central del complejo metálico puede tener lugar electroquímicamente o químicamente. Para la oxidación electroquímica se aplica a un electrodo, un potencial anódico suficiente para el correspondiente ión metálico. Para la conversión Ru^{2+}/Ru^{3+} este potencial es de preferencia por lo menos + 1,2 V, con particular preferencia de + 1,2 V a + 1,4 V (referido a un electrodo Ag/AgCl de referencia). Alternativamente puede también tener lugar químicamente la oxidación del átomo central del complejo metálico. Por ejemplo, como agentes oxidantes químicos apropiados se emplean el PbO_2 , per-manganato, compuestos de Ce^{4+} o/y peroxodisulfato.

En la oxidación química precedente, la siguiente reacción tiene lugar de preferencia separada en el espacio o/y en el tiempo, por ejemplo en dos cámaras de reacción separadas, en donde en la primera cámara de reacción, se efectúa la oxidación y en la segunda cámara se efectúa la reducción. Antes de la reducción se elimina de preferencia el exceso de agente oxidante, p. ej., por eliminación o/y, en el caso de un ensayo heterogéneo con un grupo marcador unido a una fase sólida, mediante lavado de la fase sólida. Alternativamente puede destruirse un exceso de agente oxidante también por una tercera sustancia.

Cuando se efectúa una oxidación electroquímica del complejo metálico, el procedimiento puede efectuarse en una cámara única, en la cual durante el paso de reducción se genera hidrógeno naciente o/y se introduce en la misma.

ES 2 300 647 T3

El paso de reducción del procedimiento según la invención comprende la producción de hidrógeno naciente para pasar el complejo metálico oxidado a un estado, el cual permite la emisión de un fotón quimioluminiscente. Para lograr una eficiencia máxima posible de la reducción, se prefiere que el hidrógeno naciente se produzca en la inmediata proximidad del complejo metálico, en particular a una distancia hasta un máximo de 50 nm. El hidrógeno naciente puede obtenerse electroquímicamente, químicamente o/y por ultrasonidos. La obtención electroquímica del hidrógeno naciente tiene lugar de preferencia aplicando una tensión de $\leq -1,0$ V (referido a un electrodo Ag/AgCl de referencia). La producción química de hidrógeno naciente puede efectuarse mediante reactivos ya conocidos como por ejemplo Li/butanol/H₂SO₄, Zn-Cu/etanol ó Zn/HCl. La producción de hidrógeno naciente mediante ultrasonidos tiene lugar de preferencia mediante la liberación o respectivamente la expulsión de radicales de hidrógeno de compuestos orgánicos, en particular compuestos de alquilo. La energía de los ultrasonidos está en este caso, de preferencia en el margen de 0,1 - 10 MHz, con particular preferencia, aproximadamente 1 MHz (Suslick & Price, Annu. Rev. Mater. Sci 29 (1999), 295; Mizik & Ries, Ann. NY Acad. Sci 899 (2000), 335).

Una forma de ejecución particularmente preferida del procedimiento según la invención comprende en primer lugar una oxidación química del complejo metálico y a continuación una producción electroquímica de hidrógeno naciente, p. ej., en una célula electroquímica, de forma que el hidrógeno naciente está disponible en alta concentración. Por ejemplo, en la patente EP-A-0 658 760, se describen células electroquímicas adecuadas. También en esta forma de ejecución es conveniente que la oxidación y la producción de hidrógeno naciente se efectúen en dos cámaras de reacción separadas.

Además, la presente invención se aclara mediante el siguiente ejemplo:

Ejemplo Quimioluminiscencia mediante hidrógeno naciente

Un complejo rutenio(bipiridilo)₃ (con un catión Ru²⁺) se oxidó para dar un complejo Ru³⁺. Para ello se utilizó un sistema homogéneo de Li/butanol/H₂SO₄. En un recipiente se añadió ácido sulfúrico concentrado a PbO₂ (en polvo). A continuación se recubrió con una capa sobrenadante de butanol. En el butano se disolvió el complejo de Ru²⁺ en una concentración de 1 mmoles. La oxidación del complejo de Ru²⁺ tuvo lugar en la superficie de separación entre el H₂SO₄ y el butanol. Una vez terminada la oxidación del complejo Ru²⁺ en el complejo Ru³⁺, se añadió litio. En la superficie de separación entre el H₂SO₄ y el butanol se formó hidrógeno naciente. En esta superficie límite se observó una notable quimioluminiscencia del rutenio.

También en la oxidación electroquímica del Ru³⁺ a partir del R²⁺ y consiguiente producción de hidrógeno naciente mediante Li/butanol/H₂SO₄ pudo observarse la quimioluminiscencia del Ru.

ES 2 300 647 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la detección de un analito en una muestra mediante el empleo de un complejo metálico
luminiscente como grupo marcador,

caracterizado porque,

se excita una quimioluminiscencia del complejo metálico mediante los pasos:

- 10 (i) oxidación del complejo metálico, y
- (ii) reducción del complejo metálico mediante hidrógeno nascente, con lo que aparece la forma capaz de quimioluminiscencia del complejo metálico, y
- 15 (iii) determinación del analito mediante la quimioluminiscencia.

2. Procedimiento según la reivindicación 1,

20 **caracterizado** porque,

se emplea un complejo metálico como grupo marcador, el cual contiene una estructura de fórmula general (I):



en donde

M es un catión metálico di o trivalente escogido entre las tierras raras o los cationes de los metales de transición.

30 L_1 , L_2 y L_3 son iguales o diferentes y significan ligandos con por lo menos dos heterociclos que contienen nitrógeno, en donde L_1 , L_2 , y L_3 están unidos al catión de metal mediante átomos de nitrógeno,

Y significa un engarce unido a uno de los ligandos,

35 m es un número entero de 1 a 10, y

n es un número entero de 1 a 6.

40 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2,

caracterizado porque,

el complejo metálico empleado es un complejo de rutenio.

45 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3,

caracterizado porque,

50 los ligandos del complejo metálico se esogen de sistemas anulares de bipyridina o fenantrolina.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4,

caracterizado porque,

55 el complejo metálico contiene por lo menos un grupo hidrófilo o/y un portador de carga.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5,

60 **caracterizado** porque,

el complejo metálico se emplea como conjugado con un reactivo de detección para el analito.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6,

65 **caracterizado** porque,

la detección tiene lugar como un ensayo homogéneo.

ES 2 300 647 T3

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6,
caracterizado porque,
5 la detección tiene lugar como un ensayo heterogéneo.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8,
caracterizado porque,
10 la oxidación del complejo metálico tiene lugar electro-químicamente.
10. Procedimiento según la reivindicación 9,
15 **caracterizado** porque,
la oxidación tiene lugar mediante la aplicación de un potencial anódico de por lo menos + 1,2 V (referido a un electrodo Ag/AgCl de referencia).
- 20 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8,
caracterizado porque,
la oxidación del complejo metálico tiene lugar químicamente.
25
12. Procedimiento según la reivindicación 11,
caracterizado porque,
30 la oxidación tiene lugar mediante PbO₂, permanganato, compuestos de Cer⁴⁺ o/y peroxodisulfato.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12,
caracterizado porque,
35 la reducción tiene lugar en el espacio o/y en el tiempo separadamente de la oxidación.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13,
40 **caracterizado** porque,
el hidrógeno naciente se genera en la inmediata proximidad del complejo metálico.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque,
45 el hidrógeno naciente se genera electroquímicamente.
16. Procedimiento según la reivindicación 15,
50 **caracterizado** porque,
la generación electroquímica tiene lugar mediante la aplicación de una tensión ≤ - 1,0 V referida a un electrodo Ag/AgCl de referencia.
- 55 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14,
caracterizado porque,
el hidrógeno naciente se genera químicamente.
60
18. Procedimiento según la reivindicación 17,
caracterizado porque,
65 la generación química tiene lugar mediante Li/butanol/H₂SO₄, Zn-Cu/etanol ó Zn/HCl.
19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14,

ES 2 300 647 T3

caracterizado porque,

el hidrógeno naciente se genera mediante ultrasonidos.

5 20. Procedimiento según la reivindicación 19,

caracterizado porque,

10 la generación mediante ultrasonidos tiene lugar por abstracción de los radicales de hidrógeno de compuestos orgánicos, en particular compuestos de alquilo.

21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, el cual comprende una oxidación química del complejo metálico y una generación electroquímica de hidrógeno naciente.

15 22. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 21,

caracterizado porque,

20 la oxidación y generación del hidrógeno naciente tienen lugar en dos cámaras de reacción separadas.

23. Dispositivo para la detección de un analito en una muestra mediante el empleo de un complejo metálico luminiscente como grupo marcador, el cual comprende:

25 (i) un medio para la oxidación del complejo metálico

(ii) un medio para la generación de hidrógeno naciente, y

(iii) un medio para la detección de la quimioluminiscencia

30 **caracterizado** porque,

los medios (i) y (ii) comprenden dos cámaras de reacción separadas.

35 24. Dispositivo según la reivindicación 23,

caracterizado porque,

los medios (i) están previstos para la oxidación química del complejo metálico.

40 25. Dispositivo según una de las reivindicaciones 23 ó 24,

caracterizado porque,

45 los medios (ii) están previstos para la generación electroquímica del hidrógeno naciente.

26. Procedimiento para la producción de quimioluminiscencia, el cual comprende la preparación de un complejo metálico luminiscente, la oxidación del complejo metálico y la reducción del complejo metálico mediante hidrógeno naciente, con lo cual aparece una forma capaz de quimioluminiscencia del complejo metálico, **caracterizado** porque la oxidación y la reducción tienen lugar en dos cámaras de reacción separadas.

50 27. Dispositivo para la producción de quimioluminiscencia, el cual comprende:

(i) un medio para la oxidación de un complejo metálico luminiscente, y

55 (ii) un medio para la generación de hidrógeno naciente

caracterizado porque,

60 los medios (i) e (ii) comprenden dos cámaras de reacción separadas.

65