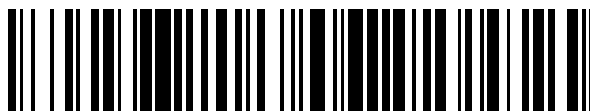


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 875 855**

51 Int. Cl.:

B41J 2/04 (2006.01)

B41J 2/14 (2006.01)

B33Y 80/00 (2015.01)

C12M 3/00 (2006.01)

A61F 2/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2018 PCT/FR2018/050533**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18167400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2018 E 18712975 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.05.2021 EP 3595901**

54 Título: **Aparato para la transferencia de biotinta**

30 Prioridad:

15.03.2017 FR 1752129

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.11.2021

73 Titular/es:

**POIETIS (100.0%)
Bioparc Bordeaux Métropole 27 Allée Charles Darwin
33600 Pessac, FR**

72 Inventor/es:

**VIELLEROBE, BERTRAND;
VAUCELLE, ROMAIN y
GUILLEMOT, FABIEN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 875 855 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

Aparato para la transferencia de biotinta

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la bioimpresión láser mediante un método de transferencia asistido por ordenador para el modelado y ensamble de material vivo y opcionalmente no vivo con una organización prescrita en 2D o 3D para el propósito de producir estructuras de bioingeniería para su uso en medicina regenerativa, en farmacología y para estudios de biología celular.

10 La bioimpresión asistida por láser permite la organización altamente precisa de los elementos individuales del tejido durante su fabricación mediante la deposición capa por capa de células y biomateriales. Permite la reproducción en 3D de tejidos con una geometría específica. El enfoque “ascendente”, basado en el ensamble ladrillo por ladrillo, luego capa por capa de un objeto, es compatible con la automatización del método de fabricación de tejidos y puede operar en un ambiente estéril. Además, la automatización podría permitir la reducción de costos, la mejora de la calidad y la reproducibilidad de la fabricación de tejidos biológicos.

15 La invención se refiere más particularmente a una solución de deposición asistida por láser con base en la acción directa (absorción de la radiación láser) e indirecta (creación de un plasma y de una burbuja de cavitación) de un rayo láser para dirigir la deposición de partículas hacia un sustrato de impresión con resolución micrométrica.

Técnica anterior

20 El artículo de F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, JC Fricain, y J. Amédée, “High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering”, Acta Biomater. 6, 2494-2500 (2010) describe un ejemplo de aparato para implementar tal método.

25 También se conocen en lo anterior las solicitudes de patente WO2016097619 y WO2016097620 que describen un método y un aparato para imprimir de al menos una tinta, dicho método que comprende una etapa de enfocar un rayo láser para generar una burbuja de cavitación en una película de tinta, una etapa de formación de al menos una gota de tinta a partir de una superficie libre de la película de tinta y una etapa de depositar dicha gota sobre una superficie de deposición de un sustrato receptor, caracterizado porque el rayo láser está orientado opuesto a la dirección de la fuerza gravitacional, con la superficie libre de la película que se orienta hacia arriba en la dirección de la superficie de deposición colocada encima de la película de tinta.

30 Esta configuración permite en particular obtener un grosor E sustancialmente constante para la película de tinta, mientras que al mismo tiempo limita la aparición de fenómenos de sedimentación. Además, permite usar una amplia gama de tintas. Esta configuración también permite usar medios de obtención de imágenes de resolución temporal (TRI) por ombroscopia para estudiar y controlar la formación de chorros.

35 Otro ejemplo de técnicas de obtención de imágenes en tiempo real aplicadas al seguimiento de la ablación con láser de neuronas se describe en la publicación “Real time imaging of femtosecond laser induced nano-neurosurgery dynamics in C. elegans”, OPTICS EXPRESS 364, vol. 18, núm. 1, 4 de enero de 2010. En esta configuración, el campo de visión es muy pequeño y está centrado en el área de ablación láser, donde se estudian un cierto número de complejos fenómenos fotoquímicos y fotobiológicos. Este es un ejemplo general de imágenes asociadas con un proceso de interacción láser-materia para micromecanizado.

40 Problema técnico de la técnica anterior

45 En el campo de la bioimpresión, las biotintas son los denominados medios no homogéneos, es decir, contienen partículas en suspensión o diferentes especies bioquímicas en solución (factores de crecimiento, moléculas biológicas, iones, etc.) o incluso biomateriales (distribuidos uniformemente en solución, o con gradientes o flujos colineales si los hay), o una mezcla más o menos compleja de estos tres constituyentes principales, siendo el último caso el más común. La complejidad de estas tintas, en particular su carácter no homogéneo, no se trata en absoluto en la técnica anterior de bioimpresión directa por láser.

50 Además, la técnica anterior ha demostrado que la densidad de partículas de una biotinta era extremadamente aleatoria (fluido coloidal), lo que conducía a una transferencia estadística de varias partículas al sustrato receptor.

55 En un contexto de este tipo, las soluciones de la técnica anterior no permitían seleccionar una composición precisa en la película de una biotinta (partículas o especies bioquímicas o biomateriales), en dependencia de características particulares que la distinguen de otros elementos que componen una biotinta presente en la película, para transferir al receptor la composición de biotinta correcta correspondiente al plan de bioimpresión predefinido.

En las soluciones de la técnica anterior, el láser interactúa con un área de la película que se supone que contiene heterogeneidades a transferir, "directa", la película contiene una densidad suficiente de partículas transferibles, o casi saturada, para garantizar la transferencia de un número suficiente de partículas.

5 La película se recarga periódicamente de manera manual con un fluido que contiene nuevas partículas, para mantener un número suficiente de partículas, lo que permite una transferencia directa. Se puede enfatizar que tal problema es, en el análisis final, común a todos los métodos de bioimpresión, particularmente de inyección de tinta y extrusión.

10 Solución aportada por la invención

Como preámbulo, lo que se entiende por "heterogeneidades" de la película de biotinta es cualquier área de la película que tenga características distintivas en términos de composición: ya sea de partículas, o de especies bioquímicas (factores de crecimiento, moléculas biológicas, iones, etc.) o de biomateriales. Generalmente, los términos "área heterogénea", "variación local de composición" y "área de composición específica" se usan como sinónimos del término genérico "heterogeneidad".

15 Para responder a estas desventajas, la invención se refiere, de acuerdo con su sentido más general, a un aparato para la transferencia de una biotinta a un objetivo que incluye:

20 - un portaobjetos transparente que define un área de recepción de una película de fluido heterogénea que contiene una pluralidad de partículas y/o una pluralidad de especies bioquímicas y/o una pluralidad de biomateriales, o una pluralidad de partículas y/o uno o más tipos de biomateriales y/o una o más especies bioquímicas y/o uno o más tipos de especies bioquímicas

25 - una fuente láser asociada con un medio de deflexión controlado y una unidad óptica para enfocar en un plano de la película de fluido para aplicar un pulso localizado,

caracterizado porque dicho aparato también incluye

30 - un medio de obtención de imágenes de un área de obtención de imágenes que tiene una sección transversal de obtención de imágenes al menos 5 veces mayor que la sección transversal nominal de una heterogeneidad de la película de biotinta

35 - medios para analizar imágenes para reconocer

40 - las posiciones geométricas de las heterogeneidades en la película

o una característica observable de cada una de las heterogeneidades (tamaño, factor de forma, tipo de partículas, edad de la partícula, densidad y tipo de biomaterial, moléculas, ...) reconocidas por los medios de caracterización (tales como por ejemplo imágenes ópticas, espectroscopía Raman o análisis de autofluorescencia) y por medios de análisis espacio-temporal (dinámica del comportamiento individual y/o de un grupo de heterogeneidades, etc.) y

45 - medios para seleccionar al menos una de las heterogeneidades así localizadas y caracterizadas, y para controlar los medios de deflexión para dirigir el rayo láser hacia la posición de la heterogeneidad y activar el disparo láser.

De acuerdo con algunas de estas variantes:

50 - el campo de obtención de imágenes superior es de 1 x 1 mm

- el campo de obtención imágenes se puede modular mediante la aplicación de una ROI (región de interés)

55 - el área de obtención de imágenes comprende el área de interacción del láser con la película de fluido

- el área de obtención de imágenes es distinta del área de interacción del láser con la película de fluido, por ejemplo, en 2 planos focales distintos o en dos áreas adyacentes del mismo plano focal.

60 - el aparato incluye un ordenador local que ejecuta el procesamiento de imágenes para la caracterización de las heterogeneidades presentes en el área de obtención de imágenes.

- el aparato incluye medios de comunicación con un ordenador remoto que ejecuta el procesamiento de imágenes para la caracterización de las heterogeneidades presentes en el área de obtención de imágenes.

65

- los medios de caracterización comprenden uno o más de los siguientes elementos: un medio de obtención de imágenes ópticas monocromáticas o multicromáticas, un espectrómetro Raman, un espectrómetro de infrarrojos o un medio para analizar la autofluorescencia endógena de las partículas y de los biomateriales.
- la película contiene células vivas, procariotas o eucariotas, en suspensión o agregadas.

5

- la película contiene uno o más biomateriales que potencialmente pueden mezclarse con células o uno o más tipos, así como también con especies bioquímicas tales como factores de crecimiento o determinadas biomoléculas. Una configuración de este tipo abre el camino a la constitución de tintas muy complejas y heterogéneas que pueden usarse como una tinta "única" para producir ciertos tejidos al simplificar el método y hacerlo más rápido y menos costoso. La complejidad residirá entonces en la capacidad de la presente invención para procesar rápidamente la localización y caracterización de múltiples áreas de partículas, biomateriales y/o especies químicas presentes en la película de fluido para permitir la fabricación controlada de tejidos complejos y personalizables.

- 10
- 15
- el sistema también se puede asociar ventajosamente con un dispositivo de recarga continua de biotinta para garantizar una buena productividad al tiempo que da acceso a una amplia gama de heterogeneidades que se deben apuntar para responder al plan de bioimpresión predefinido.

20

La invención también se refiere a un método para transferir una biotinta que comprende heterogeneidades a un objetivo que consiste en colocar en un aparato de transferencia un portaobjetos que define un área de recepción de una película de fluido transparente que contiene una pluralidad de heterogeneidades (partículas o especies bioquímicas o biomateriales) y controlar la orientación y la activación de un pulso láser emitido por un láser asociado a un medio de deflexión controlado, para provocar una interacción del rayo láser con dicha película, caracterizado porque

25

el método incluye, entre otras cosas:

30

a) al menos una etapa de obtener imágenes de un área de la película que tiene una sección transversal de obtención de imágenes al menos 5 veces mayor que la sección transversal nominal de una heterogeneidad

35

b) al menos una etapa de análisis de imágenes para reconocer las posiciones geométricas de las heterogeneidades y al menos una característica observable de cada una de las heterogeneidades reconocidas (tamaño, factor de forma, tipo de partículas, edad de la partícula, tipo y densidad del biomaterial, molécula, ...) y

c) al menos una etapa de seleccionar una de las heterogeneidades así localizadas y caracterizadas, y

40

d) al menos una etapa de transferencia que comprende controlar los medios de deflexión para dirigir el rayo láser hacia la posición de la heterogeneidad seleccionada y controlar la activación de un disparo láser.

45

De acuerdo con las variantes del método:

- también incluye una etapa de obtención de imágenes, análisis y caracterización y una pluralidad de etapas de transferencia, cada una correspondiente a al menos un área de transferencia localizada y caracterizada.

- incluye, por un lado, etapas alternadas de obtención de imágenes, análisis y caracterización, y por otro, etapas de transferencia.

- incluye una etapa de calcular una secuencia ordenada de áreas a transferir.

- la etapa de obtención de imágenes incluye procesar las imágenes sin procesar para extraer patrones simplificados que corresponden a las áreas a transferir.

- las etapas de cálculo de la posición y la caracterización de las áreas a transferir se realizan simultáneamente.

- las etapas de cálculo de la posición y caracterización de las áreas a transferir se realizan mediante procesamiento con base en algoritmos ejecutados en procesadores de arquitectura paralela.

- incluye una etapa adicional de comparar una imagen del área impresa después de una transferencia, y un mapa de las implantaciones teóricas.

- incluye una etapa adicional de activar una nueva transferencia para corregir la diferencia entre la transferencia observada y la implantación teórica.

- dicha película contiene células vivas,

- dicha película contiene uno o más tipos de especies bioquímicas,
- dicha película contiene uno o más tipos de biomateriales,
- dicha película contiene diferentes concentraciones del mismo biomaterial,
- el método también puede comprender medios para recargar la película con biotinta que permiten que el área de disparo del láser se llene de manera continua o discontinua. Por lo tanto, las heterogeneidades de la biotinta están necesariamente en movimiento dentro de la película, lo que implica el uso de medios adecuados de adquisición y procesamiento de datos para caracterizar la biotinta de forma rápida y segura. Estos medios pueden cubrir el uso de imágenes, espectroscopía, análisis fisicoquímico, medición en línea, etc.

Lo que se entiende por "heterogeneidad" en el sentido de la presente invención es un área de interés de la biotinta de composición orgánica, mineral o viva, en particular:

- partículas nanoscópicas tales como exosomas u otras vesículas producidas por células o nanopartículas de biomateriales (hidroxiapatita) o nanocápsulas de biomoléculas (factores de crecimiento),
- partículas microscópicas tales como células vivas (células eucariotas, células madre, glóbulos, ...), micropartículas de biomateriales, microcápsulas de biomoléculas (factores de crecimiento),
- partículas mesoscópicas tales como esferoides que consisten en grupos de células o biomateriales.

Preferentemente, dentro del contexto de la bioimpresión, lo que se entiende por partículas son objetos que tienen propiedades biológicas, tales como células vivas, exosomas o biomoléculas, por ejemplo.

Sin embargo, este aparato y el método correspondiente no se limitan a esta definición de acuerdo con la invención. De hecho, las partículas también pueden ser no biológicas (es decir, inertes) y consisten, por ejemplo, en uno o más biomateriales, su naturaleza que depende de la aplicación pretendida.

Descripción detallada de una modalidad no limitante

Otras características y ventajas serán reveladas por la descripción de la invención que sigue, la descripción se da solo por medio de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- La Figura 1 muestra una vista esquemática de un aparato de acuerdo con la invención.
- La Figura 2 muestra vistas de las imágenes adquiridas.

Contexto de la invención

La invención se enmarca dentro del campo de la bioimpresión láser (LAB) que tiene como objetivo la reconstrucción de tejidos humanos en 3D. El principio de la LAB consiste en enfocar un láser para crear un plasma por absorción sobre una película de biotinta que consiste en una solución de biomateriales, de especies bioquímicas y/o una suspensión celular en un medio líquido. A partir de este plasma, se genera una burbuja de cavitación en la biotinta. Esta burbuja, por su movimiento hidrodinámico, permite que la superficie libre de la biotinta se deforme hasta crear un chorro de materia. Las características del chorro dependen de una gran cantidad de parámetros físicos. Es por este chorro (que contiene un pequeño número de células, biomateriales o especies químicas) que se produce la transferencia de material al sustrato receptor de forma controlada.

En este contexto, es conveniente imprimir los componentes de los tejidos biológicos de acuerdo con patrones/localizaciones muy precisos para obtener

- objetos 2D/3D que tendrán propiedades (formas y funciones) lo más cercanas posible a los tejidos vivos nativos.
- o quimeras que permiten complicar/probar/simular contextos biológicos para mejorar la comprensión de la morfogénesis de tejidos o los mecanismos de respuesta biológica a agentes externos (agentes activos).

Por lo tanto, la impresión de biomateriales realizada conjuntamente con la de células también debe seguir esquemas de impresión muy específicos para dar un entorno viable a las células impresas para lograr el objetivo requerido. En resumen, el control de la cantidad y la posición de las células/biomateriales/especies bioquímicas impresas sobre el sustrato receptor es fundamental para lograr la calidad necesaria y esperada de los objetos bioimpresos.

El objetivo de la presente invención es implementar un medio de medición que permita identificar/mapear las áreas de composición específica en una biotinta heterogénea antes de que se impriman y así emitir al láser la orden de dibujar específicamente en un área de la composición deseada en dependencia del área a imprimir (en el "receptor") y el patrón diseñado durante el CAD del objeto objetivo.

- 5 A tal efecto, la invención consiste en:
- i) realizar una caracterización 2D del donante
 - 10 ii) detectar las heterogeneidades mediante un proceso digital ad hoc
 - iii) mapear automáticamente las posiciones de las áreas de composición específicas
 - 15 iv) hacer que el esquema de los disparos láser (trayectorias de impresión) se corresponda con el mapeo de las áreas de composición específica del donante

Dentro del contexto de la bioimpresión, más particularmente durante el desarrollo de nuevos modelos, los marcadores pueden usarse temporalmente para marcar las células con agentes externos (marcaje inmunológico, fluorescencia...) para ayudar en la caracterización de los objetos impresos. Por otro lado, durante la producción de modelos destinados a aplicaciones in vitro o in vivo, las células deben permanecer totalmente libres de cualquier perturbación exógena debido a que constituyen los bloques de construcción básicos del tejido objetivo. Por lo tanto, pueden no estar marcados por agentes externos en esos casos. Por lo tanto, la detección de las células será relativamente complicada dentro de los medios de cultivo debido a que su índice de refracción es bastante cercano al del agua, el principal constituyente de estos medios. Por lo tanto, las imágenes celulares ya presentan un problema considerable por resolver.

Además, la dinámica de llenado del cabezal de impresión o el movimiento natural de las celdas en suspensión tienen un efecto directo sobre la posición de las celdas a lo largo del tiempo. Esto implica detectar repetidamente su posición, y a alta frecuencia, si se desea que la trayectoria de impresión láser sea siempre congruente con el mapeo de su localización. La consecuencia de los medios de detección y mapeo, que deben operar a altas velocidades (tanto para la parte de hardware que permite la adquisición de datos como para la parte de software que permite procesar los datos), es directa.

- El problema planteado, y que la invención pretende resolver, es por tanto múltiple:
- detectar variaciones locales de composición de las biotintas (heterogeneidades) que son difíciles de visualizar (medios de obtención de imágenes + procesamiento de imágenes),
 - mapear las heterogeneidades (procesamiento de imágenes que permite dar tanto su número como su posición en el donante)
 - realizar disparos láser en correspondencia con el mapeo (adaptación en tiempo real de la trayectoria de impresión)

- De acuerdo con una variante, esta invención también tiene como objetivo cubrir casos muy interesantes de clasificación celular:
- ser capaz de distinguir entre células vivas y células muertas para imprimir solo células vivas
 - ser capaz de disociar dos tipos de células que pueden haberse mezclado (voluntariamente por cocultivo o no) en la misma tinta
 - ser capaz de distinguir células del mismo tipo, pero con una fuerte disparidad (células madre, diferentes niveles de diferenciación/madurez)
 - ser capaz de distinguir áreas de concentración del mismo biomaterial que estaría presente en el área de observación, y producido voluntariamente o no
 - ser capaz de distinguir diferentes biomateriales que se habrían mezclado en la misma biotinta.

- A nivel de desempeño, la función "Apuntar y Disparar", objeto de la invención, debe permitir:
- racionalizar el proceso de impresión (relación entre el número de células impresas y el número de células presentes en la biotinta), también denominado "Rendimiento de Impresión". Esto equivale a minimizar el número de células no usadas durante el proceso.

- optimizar el proceso mediante la selección de áreas de disparo láser en dependencia del número de células presentes espacialmente (sin recurrir a múltiples disparos láser para imprimir la misma área). Esto equivale a optimizar la trayectoria de impresión para minimizar el número de disparos y así minimizar el estrés celular.
- acelerar el proceso (si es necesario) debido a la efectividad de los disparos láser, también denominado "Velocidad de Impresión"
- hacer que el método sea compatible con un cartucho de recarga continua debido a que el método "Apuntar y disparar" debe permitir la medición de los desplazamientos de las células en la biotinta, donde el flujo será relativamente grande, en cualquier momento.

Los desafíos también son:

- hacer posible la impresión de células en pequeñas cantidades es poco común debido al control del "Rendimiento de impresión". Este es un punto extremadamente importante con respecto a ciertas aplicaciones farmacéuticas, cosmetológicas o clínicas donde el número de células disponibles es muy pequeño.
- hacer posible una personalización muy amplia de los modelos de tejido mediante la selección controlada del área de disparo del láser en dependencia del número de células presentes espacialmente. Por lo tanto, la respuesta a los requisitos de desarrollo de tejidos funcionales por parte de los laboratorios o la industria será alcanzable con una paleta muy amplia de mercados y de aplicaciones, posibilitada por la alta resolución y la alta precisión del proceso láser asistido por Apuntar y Disparar.
- abrir la puerta a la industrialización del método y al aumento de su productividad debido a la aceleración del proceso ("Velocidad de Impresión") por la efectividad sistemática de los disparos láser garantizados por la función Apuntar y Disparar
- simplificar mucho el uso de la tecnología debido a que el manejo de las tintas biológicas se optimizará y automatizará con el cartucho recargado continuamente
- controlar el número de partículas transferidas en cualquier momento durante el proceso de bioimpresión (comparación predisparo láser/postdisparo láser) para asegurar una buena coincidencia entre el patrón impreso y el patrón diseñado por CAD.
- reducir el costo de los dispositivos de bioimpresión al integrar un solo cartucho (o un número reducido de cartuchos), en el que se colocarían los diferentes constituyentes del tejido, se clasificarían en el momento de la transferencia. Potencialmente, la reducción de costos podría incluso allanar el camino para la definición de un cartucho de un solo uso, lo que sería un gran beneficio para el uso de la bioimpresión en el campo clínico.

Descripción del aparato

- Comprende una cámara (1) que consta de un sensor de alta definición, por ejemplo, 18 millones de píxeles. Por medio de ejemplo, la cámara (1) es un sensor comercializado con el nombre "USB 3 uEye CP" por la empresa IDS.
- Esta cámara (1) está asociada a una segunda unidad óptica de conjugación de imágenes (2) que actúa como lente de campo y asegura así la conjugación de la imagen entre el plano focal de la película (3) y el plano del sensor de la cámara (1).
- La película (3) se coloca frente a un objetivo (11) al que se transfieren las células o partículas, durante la activación de un pulso láser.
- Por medio de ejemplo, la segunda unidad óptica de conjugación de imágenes (2) consta de un objetivo preferentemente telecéntrico que comprende al menos 2 lentes optimizadas para el rango visible.
- La trayectoria óptica es devuelta por un portaobjetos dicróico de paso alto (4), que transmite infrarrojos (correspondiente a la longitud de onda de emisión del láser (5)) y refleja la longitud de onda en el rango visible.
- El aparato incluye así una fuente de luz (6) que emite en el rango visible, asociada a la óptica de conformación (7) cuya función es colimar la fuente de luz (6) si es necesario, por ejemplo cuando la fuente tiene divergencia en el haz emitido. Esta fuente de luz puede ser una única fuente de LED, un componente que consta de un conjunto de LED, o una fuente de luz blanca del tipo incandescente, lámpara halógena, supercontinuo.... También puede constar de una fuente de espectro estrecho (ya sea por la propia naturaleza de la tecnología empleada o por el uso de filtros

ópticos) que emite en la longitud de onda que permite la excitación de la fluorescencia de los marcadores o de las partículas.

5 Un portaobjetos de separación (8) tiene la función de superponer la trayectoria de iluminación óptica y la trayectoria de observación óptica.

10 En la salida del portaobjetos dicroico (4), los dos rayos se dirigen hacia el escáner (iluminación y láser), son mutuamente colineales y también son colineales de facto con el haz de imagen que regresa de la película. Así, los tres haces son colineales entre el portaobjetos dicroico (4) y la película de tinta (3).

10 Son desviados por un escáner (9) que proporciona una orientación controlada por un ordenador externo.

15 El escáner (9) proporciona una orientación angular de los tres haces colineales mencionados anteriormente, a lo largo de dos ejes perpendiculares, 2 de ellos son barridos por el donante que contiene la biotinta y el último es "desbarrido" en un haz de imagen colimada hacia el sistema de imágenes. Por ejemplo, está constituido por dos espejos accionados por un actuador electromagnético, por ejemplo un escáner comercializado por la empresa SCANLAB (marca comercial) con el nombre "SCANcube 14".

20 Los tres haces, observación, iluminación y láser, son por tanto colineales y orientados en la misma dirección a la salida del escáner (9). Por lo tanto, la dirección de observación y la dirección de la iluminación siguen la orientación del rayo láser.

La unidad óptica (10) tiene como función:

25 a) transformar la orientación angular en un posicionamiento/desplazamiento lateral a lo largo de dos ejes X, Y en el plano de la película (3),

b) enfocar el rayo láser y el rayo de luz en el mismo plano de la película (3) y

30 c) recoger la luz en el rango visible devuelta por la película (3), reconstruir la imagen de observación por la cámara (1).

35 La unidad óptica (10) consta de un conjunto de lentes que forman un objetivo telecéntrico que tiene las siguientes características:

En el rango de infrarrojos, las superficies de las lentes se tratan con recubrimientos antirreflejos para tolerar altas energías láser. Esto permite evitar el deterioro en el tiempo de la primera unidad óptica (10) cuyo diseño está calculado, además, para evitar la creación de puntos "calientes" láser dentro de dicha primera unidad óptica (10).

40 El espejo dicroico (4) evita el retorno de la radiación láser infrarroja a la cámara (1), durante la activación de un pulso. Opcionalmente, también se puede colocar un filtro de rechazo de infrarrojos en la trayectoria óptica, entre el filtro dicroico (4) y la cámara (1).

45 La relación entre la distancia focal de la segunda unidad óptica (2) y la distancia focal del objetivo (10) se determina para producir, en el plano de la cámara (1), una imagen en la que los objetos más pequeños observados tengan un tamaño de más de un píxel.

50 El aparato también incluye un ordenador (12) que recibe datos que se originan en la cámara (1) así como también de una segunda cámara (13) que observa el objetivo (11). Este ordenador (12) también controla el escáner (9) así como también el láser (5).

Funcionamiento

55 El ordenador (12) ejecuta programas informáticos para realizar diferentes procesos:

- un procesamiento previo de las imágenes sin procesar que se originan en la cámara (1)

60 - procesamiento de localización y caracterización de las partículas identificadas durante el preprocesamiento antes mencionado.

- un proceso de control del escáner (9) y el láser (5), lo que permite que sus disparos se correspondan con las posiciones de las partículas

65 - opcionalmente, el procesamiento de las imágenes en sin procesar que se originan en la cámara (13) que observa el objetivo (11).

Preprocesamiento de las imágenes sin procesar que se originan en la cámara

Este preprocesamiento se puede realizar periódicamente, para registrar un mapeo de la película (3) antes de la aplicación de una secuencia de disparos láser, o entre dos secuencias consecutivas de disparos.

5 La primera solución es particularmente adecuada para situaciones en las que la película transporta partículas estables, tanto en lo que se refiere a la localización en el plano de la película como en su evolución. Esto se refiere, por ejemplo, a partículas minerales u orgánicas que son ligeramente reactivas con respecto al sustrato.

10 La segunda solución se adapta mejor a situaciones en las que las partículas son móviles y cambiantes. Este es el caso, por ejemplo, de partículas vivas tales como las células, que pueden moverse dentro de la película con una fuerte tendencia a la agregación que dependerá en gran medida del tipo de célula y del medio usado.

15 En ambos casos, el procesamiento consiste en extraer, a partir de imágenes sin procesar, información correspondiente a la detección de objetos gráficos correspondientes a partículas de interés, por ejemplo mediante técnicas de segmentación, de reconocimiento de formas o reconocimiento de contornos y centros de gravedad.

20 Se pueden usar técnicas de umbralización de la cuenca, el algoritmo de inundación de Meyer o el tipo de algoritmo de bosque de expansión óptima para realizar este mapeo.

Este procesamiento se puede dividir en varias fases:

- una fase de restauración o acondicionamiento de las imágenes sin procesar (eliminación de ruido, eliminación de borrones, corrección de iluminación no uniforme),
- 25 - una fase de segmentación
- una fase de extracción de características
- 30 - y una fase de análisis de datos.

Este proceso atribuye a cada objeto gráfico identificado un identificador ID y una posición en forma de coordenadas cartesianas (X_i , Y_i) en el plano de la película.

35 La Figura 2 muestra la sucesión de imágenes, que comienza con la imagen sin procesar (20) capturada por la cámara (1), y con un área ampliada (21) que muestra la presencia de una pluralidad de partículas en el campo de la imagen.

40 El procesamiento por umbralización se lleva a cabo de manera conocida para calcular una variación de contraste en forma de histograma como se ilustra en la imagen (22). Este histograma permite calcular una imagen contrastada (23) mediante algoritmos de umbralización.

Esta imagen contrastada (23) permite calcular los centroides (imagen (24)) y los contornos (imagen (25)).

45 Esta información permite construir la tabla (26) de los identificadores de cada objeto gráfico procesado y de las coordenadas del centro de cada uno de estos objetos.

El proceso de caracterización consiste en asignar atributos a cada uno de los objetos gráficos identificados y localizados en dependencia de la pertenencia a una familia predefinida por estos parámetros físicos tales como:

- 50 - la clase de tamaño del objeto
- reacción a una iluminación específica, por ejemplo, por fotoluminiscencia
- 55 - características espectrales
- el tipo de contorno (forma, regularidad, ...)
- pertenencia a un agregado de objetos
- 60 - la densidad óptica del objeto
- la densidad del agregado (número estimado de objetos agregados).
- 65 - dinámica espacio-temporal

- ...

Por supuesto, estos parámetros no son limitantes.

5 El resultado de este procesamiento completa la tabla antes mencionada al agregar, para cada identificador, información relativa a la pertenencia a una o más series de clases.

Preferentemente, el procesamiento se paraleliza y se ejecuta en procesadores con arquitectura paralela, particularmente GPU.

10 A continuación, la información se usa para poner en correspondencia el mapeo así realizado y la tarjeta objetivo previamente grabada, para calcular una secuencia de disparos láser manifestada por el cálculo de una orientación del escáner, seguido por la activación del pulso láser, bajo el control del ordenador (12). El cálculo de la secuencia tiene en cuenta un cálculo para minimizar el tiempo de proceso global, mediante el uso de algoritmos conocidos del tipo de problema "solución del problema de optimización del viajante de comercio" o "NP-completo".

15 Después de cada disparo láser o después de una serie de disparos láser, el ordenador verifica la conformidad de las transferencias mediante una comparación entre la imagen transmitida por la cámara (13) que observa el objetivo (11) y la tarjeta objetivo pregrabada. El ordenador procede con un cálculo de máxima probabilidad y, en caso de discordancia (falta de objetos impresos), recalcula la siguiente secuencia de disparos láser para corregir las anomalías observadas. También puede permitir proceder con una corrección de las áreas donde pueden haberse impreso demasiados objetos con respecto a la tarjeta objetivo. Esta corrección se produce generalmente por medios de succión convencionales que permiten retirar pequeñas cantidades de material con mucha precisión. Esta succión es controlada por el ordenador (12). En todos los casos, lo que se entiende aquí por control es la implementación de un servo bucle entre la tarjeta objetivo pregrabada y el objetivo (11) realmente impreso, que debe permitir obtener una probabilidad máxima lo más cercana posible al 100 % entre las dos tarjetas.

20 Además, la presente invención no se limita a un solo proceso de impresión láser. Cubre de hecho la impresión de múltiples cabezales (varias películas (3) usadas al mismo tiempo con uno o más láseres), para lo cual es imperativo que los medios de obtención de imágenes y su procesamiento asociado sean capaces de procesar varias áreas simultáneamente para garantizar la posibilidad de realizar una impresión "multicolor" simultánea (varios tipos de células impresas en un solo proceso).

30

REIVINDICACIONES

1. Aparato para transferir biotinta a un objetivo, que comprende:
- 5 - un portaobjetos transparente en el rango espectral de la imagen y del láser (5), cuyo portaobjetos define un área para recibir una película de fluido (3) que contiene heterogeneidades;
 - una fuente láser (5) asociada a un medio de deflexión controlado y un sistema óptico (10) para enfocar en un plano de la película de fluido (3) con el propósito de aplicar un pulso localizado,
- 10 **caracterizado porque** dicho aparato comprende además:
- medios para obtener imágenes de un área de obtención de imágenes que tiene una sección transversal de obtención de imágenes al menos 5 veces mayor que la sección transversal nominal de una inhomogeneidad;
- 15 - medios para analizar imágenes con el propósito de reconocer
- las posiciones geométricas de las inhomogeneidades en la película, y
 - una característica observable de cada una de las inhomogeneidades reconocidas, por ejemplo, tamaño, relación de aspecto, tipo de partículas, edad de la partícula, densidad, tipo de biomaterial o molécula, que puede observarse mediante medios de análisis apropiados; y
- 20 - medios para seleccionar al menos una de las zonas no homogéneas así localizadas y caracterizadas, y para controlar los medios de deflexión para dirigir el rayo láser hacia la posición de dicha zona no homogénea y activar el disparo láser.
- 25 2. Aparato para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la inhomogeneidad de dicha biotinta consiste en partículas.
- 30 3. Aparato para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la inhomogeneidad de dicha biotinta consiste en biomateriales.
4. Aparato para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la inhomogeneidad de dicha biotinta consiste en especies bioquímicas.
- 35 5. Aparato para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la inhomogeneidad de dicha biotinta consiste en una combinación de partículas y/o biomateriales y/o especies bioquímicas.
- 40 6. Aparato para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicha área de obtención de imágenes incluye el área de interacción entre el láser y la película de fluido.
7. Aparato para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicha área de obtención de imágenes está separada del área de interacción entre el láser y la película de fluido.
- 45 8. Aparato para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende un ordenador local que realiza el procesamiento de imágenes para la caracterización de las inhomogeneidades presentes en el área de obtención de imágenes.
- 50 9. Aparato para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende medios para comunicarse con un ordenador remoto que realiza el procesamiento de imágenes para la caracterización de las inhomogeneidades presentes en el área de obtención de imágenes.
10. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicha película contiene células vivas.
- 55 11. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende una pluralidad de áreas de interacción láser-material.
12. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende un sistema de succión para eliminar el exceso de elementos impresos de la zona de impresión.
- 60 13. Método para transferir biotinta a un objetivo, que comprende disponer, en un aparato de transferencia, un portaobjetos transparente que define un área para recibir una película de fluido transparente que contiene una pluralidad de inhomogeneidades, y controlar la orientación y activación de un pulso láser que se emite mediante un láser y está asociado a un medio de deflexión controlado, con el propósito de provocar la interacción entre el rayo láser y dicha película,
- 65 **caracterizado porque**

el método comprende además:

- 5 e) al menos una etapa de obtener imágenes de un área de la película que tiene una sección transversal de obtención de imágenes al menos 5 veces mayor que la sección transversal nominal de una inhomogeneidad;
- f) al menos una etapa de analizar las imágenes para reconocer las posiciones geométricas de las inhomogeneidades y al menos una característica observable de cada una de las inhomogeneidades reconocidas, por ejemplo, tamaño, relación de aspecto, tipo de partículas, edad de la partícula, densidad del biomaterial, tipo de biomaterial o molécula; y
- 10 g) al menos una etapa de seleccionar una de las inhomogeneidades así localizadas y caracterizadas; y
- h) al menos una etapa de transferencia que incluye controlar los medios de deflexión para dirigir el rayo láser hacia la posición de una inhomogeneidad y controlar la activación de un disparo láser.
14. Método para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** las heterogeneidades a transferir son una combinación de partículas y/o biomateriales y/o especies químicas.
- 15
15. Método para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** comprende una etapa de obtención de imágenes, análisis y caracterización y una pluralidad de etapas de transferencia, cada una correspondiente a al menos una inhomogeneidad localizada y caracterizada.
- 20
16. Método para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** comprende una etapa de calcular una secuencia ordenada de inhomogeneidades a transferir.
17. Método para transferir biotinta a un objetivo de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado porque** comprende una etapa adicional de activar una transferencia adicional con el propósito de corregir la diferencia entre la transferencia observada y la implantación teórica.
- 25

Figura 1

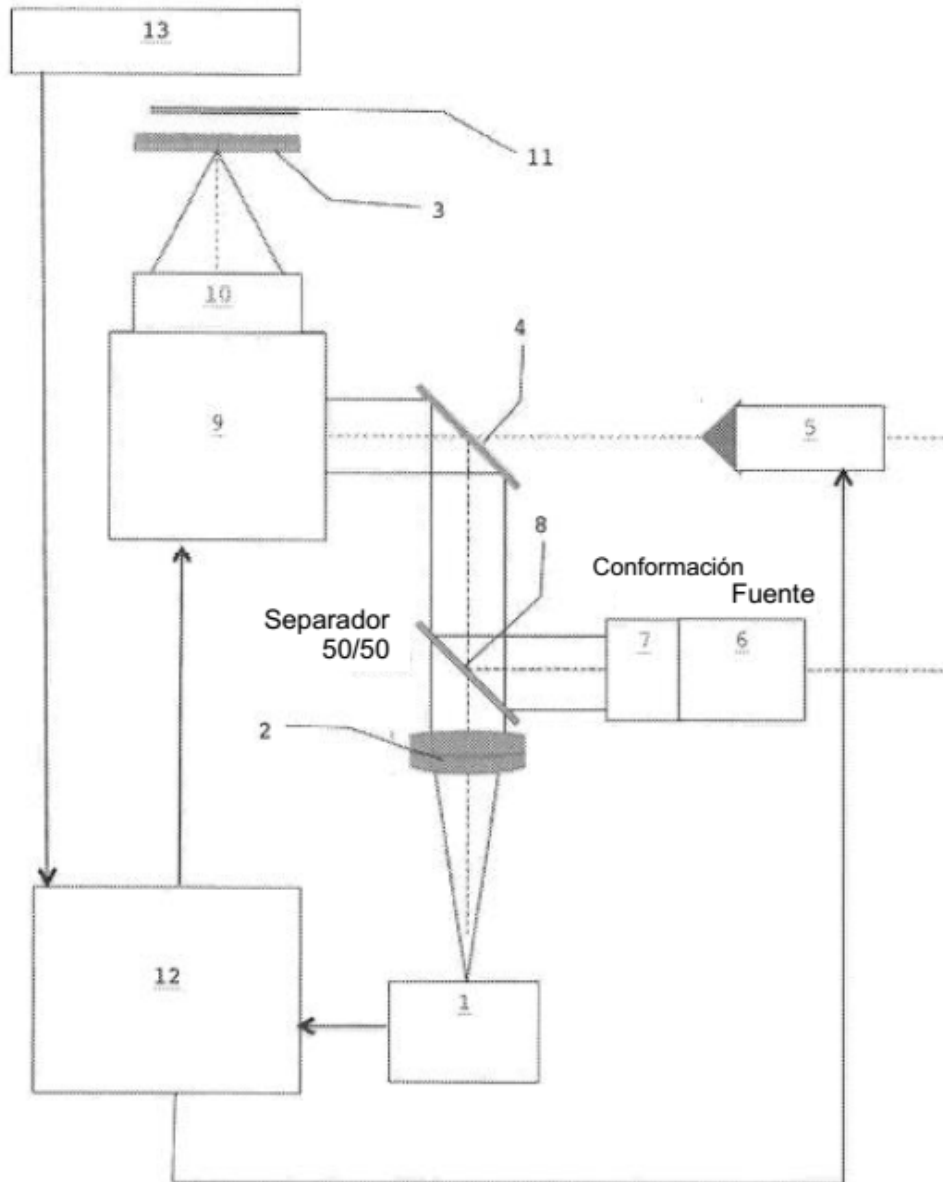


Figura 2

