



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110402197 B

(45) 授权公告日 2022.03.15

(21) 申请号 201880018034.X

F·古雷莫特

(22) 申请日 2018.03.08

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110402197 A

代理人 王小东 黄纶伟

(43) 申请公布日 2019.11.01

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

B41J 2/04 (2006.01)

B41J 2/14 (2006.01)

1752129 2017.03.15 FR

B33Y 80/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.12

C12M 3/00 (2006.01)

A61F 2/50 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2018/050533 2018.03.08

(56) 对比文件

WO 2017011854 A1, 2017.01.26

WO 2016097620 A1, 2016.06.23

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/167400 FR 2018.09.20

WO 2016097619 A1, 2016.06.23

CN 1712954 A, 2005.12.28

(73) 专利权人 波艾蒂斯公司
地址 法国佩萨克

CN 102325626 A, 2012.01.18

(72) 发明人 B·维勒罗贝 R·沃塞勒

审查员 王文静

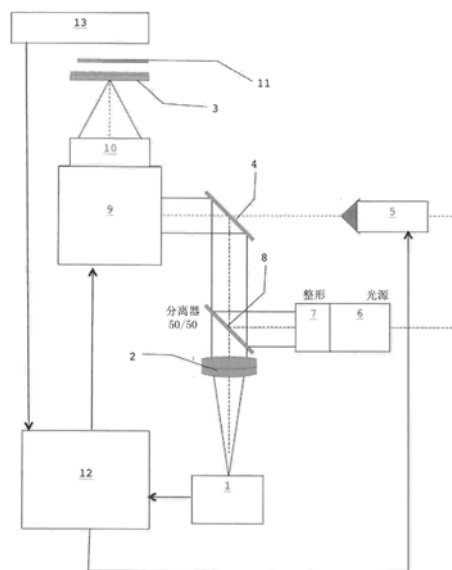
权利要求书3页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

生物墨水转移设备和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于将生物墨水转移到目标物的设备,该设备具有:成像和激光(5)的光谱范围中的透明板,其限定用于包含不均匀的流体膜(3)的接收区域;激光源(5),其与受控制偏转装置和用于聚焦在流体膜(3)的平面中的光学单元(10)关联以便施加局部脉冲,其特征在于,所述设备还包括成像装置和用于分析图像的装置,该用于分析图像的装置用于识别膜中的不均匀的几何位置并且通过适当的分析装置对识别出的不均匀中的每个的可观察到的特征(大小、形状因子、粒子类型、粒子寿命、密度、生物材料类型、分子等)进行识别,所述设备还包括用于选择因此定位和表征的不均匀区域中的至少一个的选择装置以及用于控制偏转以便将激光束导向所述不均匀区域的位置并且触发激光的发射的装置。本发明还涉及用于实现本发明的方法。



1. 一种用于将生物墨水转移到目标物的设备,该设备包括:
 - 板,该板限定用于包含多个不均匀物质的流体膜(3)的接收区域;
 - 激光器(5),该激光器与受控制的偏转装置和用于将由所述激光器发射的激光束聚焦在所述流体膜(3)的平面中的光学单元(10)关联以施加局部脉冲,所述板对于所述激光束是透明的,其特征在于,所述设备还包括:
 - 用于对成像区域进行成像的成像装置,所述成像区域具有成像横截面,该成像横截面是一个不均匀物质的标称横截面的至少5倍大,所述板在对所述成像装置的光谱中是透明的;
 - 图像分析装置,该图像分析装置用于:
 - o 识别所述流体膜中的不均匀物质的几何位置;以及
 - o 通过分析仪器,对识别出的不均匀物质中的每个的可观察特性进行识别,以及
 - 用于选择被识别的所述不均匀物质中的至少一个以及用于控制所述偏转装置以将所述激光束导向选择出的所述不均匀物质的位置并触发激光脉冲的装置。
2. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述生物墨水的不均匀物质由粒子组成。
3. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述生物墨水的不均匀物质由生物材料构成。
4. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述生物墨水的不均匀物质由生化物质构成。
5. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述生物墨水的不均匀物质由粒子、生物材料和生化物质中的两者或三者的组合构成。
6. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述成像区域大于 $1 \times 1 \text{ mm}$ 。
7. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述成像区域包括所述激光束对所述流体膜产生作用的区域。
8. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述设备包括本地计算机,所述本地计算机执行用于表征所述成像区域中存在的不均匀物质的图像处理。
9. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述设备包括与远程计算机通信的装置,所述远程计算机执行用于表征所述成像区域中存在的不均匀物质的图像处理。
10. 根据权利要求1所述的用于将生物墨水转移到目标物的设备,其特征在于,所述分析仪器包括光谱仪。
11. 根据权利要求1所述的设备,其特征在于,所述流体膜包括活细胞。
12. 根据权利要求1所述的设备,其特征在于,所述设备包括几个激光-材料作用区域。
13. 根据权利要求1所述的设备,其特征在于,所述设备包括用于从所述目标物的转移区域中去除过量的不均匀物质的抽吸系统。
14. 根据权利要求1所述的设备,其特征在于,所述设备包括对所述目标物进行成像的装置。

15.一种用于将生物墨水转移到目标物的方法,该方法包括:

将透明板置于转移设备中,该透明板限定用于包含多个不均匀物质的透明流体膜的接收区域;并且

控制由与受控制的偏转装置关联的激光器发射的激光脉冲的定向和激活,以致使激光束对所述流体膜产生作用,

其特征在于,所述方法还包括:

a) 对所述流体膜中的区域进行成像的至少一个步骤,所述区域具有成像横截面,该成像横截面是一个不均匀物质的标称横截面的至少5倍大;

b) 至少一个图像分析步骤,用于识别所述不均匀物质的几何位置以及对识别出的不均匀物质中的每个的至少一个可观察特性进行识别;

c) 选择被识别的所述不均匀物质中的一个不均匀物质的至少一个步骤;以及

d) 至少一个转移步骤,该步骤包括控制所述偏转装置以便将激光束导向选择出的所述不均匀物质的位置并且对触发激光脉冲进行控制。

16.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,待转移的所述不均匀物质是粒子。

17.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,待转移的所述不均匀物质是生物材料。

18.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,待转移的所述不均匀物质是生化物质。

19.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,待转移的所述不均匀物质是粒子、生物材料和化学物质中的两者或三者的组合。

20.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,所述方法包括成像、分析和表征步骤以及多个转移步骤,每个转移步骤对应于被定位和表征的至少一个不均匀物质。

21.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,所述方法包括将成像、分析和表征步骤与转移步骤交替进行。

22.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,所述方法包括计算待转移的不均匀物质的有序序列的步骤。

23.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,成像步骤包括处理原始图像,以提取与成像的所述不均匀物质对应的简化图案。

24.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,同时执行计算所述不均匀物质的位置的步骤和表征所述不均匀物质的步骤。

25.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,通过用在具有并行架构的处理器上执行的算法进行处理,执行计算所述不均匀物质的位置的步骤和表征所述不均匀物质的步骤。

26.根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,所述方法包括将转移之后的转移区域的图像与理论植入的图进行比较的附加步骤。

27.根据权利要求26所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法,其特征在于,所述方法包括触发新转移以校正所述转移区域的图像与所述理论植入的图之间的差异的附加步

骤。

28. 根据权利要求26所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法, 其特征在于, 所述方法包括用于校正所述转移区域的图像与所述理论植入的图之间的差异的附加抽吸步骤。

29. 根据权利要求15所述的用于将生物墨水转移到目标物的方法, 其特征在于, 所述流体膜包括活细胞。

生物墨水转移设备和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及通过计算机辅助转移过程进行激光生物打印的领域,该过程用于建模和用预定的2D或3D组织组装活体材料和可选的非活体材料,以便产生用在再生医学、药理学和细胞生物学研究中的生物工程结构。

[0002] 激光辅助的生物打印使得能够在借助细胞和生物材料逐层沉积制造组织期间以高精度安排组织的个体元件。这样允许再现具有特定几何形状的3D组织。基于逐块然后逐层地组装物体的“自下而上”方法与组织制造过程的自动化兼容并且可在无菌环境中操作。另外,自动化可使成本降低,提高生物组织制造的质量和再现性。

[0003] 更具体地,本发明涉及基于激光束的直接(吸收激光辐射)和间接(产生等离子体和空泡)作用以引导粒子以一定的微测分辨率沉积在打印基板上的激光辅助沉积溶液。

背景技术

[0004] 文章“F.Guillemot、A.Souquet、S.Catros、B.Guillotin、J.Lopez、M.Faucon、B.Pippenger、R.Bareille、M.Rémy、S.Bellance、P.Chabassier、J.C.Fricain和J.Amédée的“High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering”,《生物材料》(Acta Biomater).6,2494-2500(2010)”描述了实现此过程的设备的示例。

[0005] 在现有技术中,专利申请W02016097619也是已知的,该申请描述了用至少一种墨水进行打印的方法和设备,所述方法包括聚焦激光束以便在墨水膜中产生空泡的步骤、从墨水膜的自由表面形成至少一个墨滴的步骤以及将所述墨滴沉积在接收基板的沉积表面上的步骤,其特征在于,激光束的定向与重力的方向相反,膜的自由表面被朝向放置在墨水膜上方的沉积表面定向。

[0006] 该配置使得尤其能够获得墨水膜的基本恒定的厚度E,同时限制沉降现象的发生。除此之外,能够使用各种各样的墨水。该配置还允许使用影子图的时间分辨成像(TRI)来研究和控制喷射的形成。

[0007] 应用于监视神经元激光消融的实时成像技术的另一个示例在出版物“Real time imaging of femtosecond laser induced nano-neurosurgery dynamics in C.elegans”(《光学快报》(OPTICS EXPRESS),2010年1月4日的第18卷第1期第364页)。在这种配置中,视场非常小并且集中在激光消融区域中,其中研究了许多复杂的光化学和光生物现象。这是与用于微加工的激光-物质相互作用过程关联的成像的一般示例。

发明内容

[0008] 现有技术的技术问题

[0009] 在生物打印领域,生物墨水是所谓的不均匀介质,即,它们含有在溶液中的悬浮粒子或不同生化物质(生长因子、生物分子、离子等)或生物材料(均匀分布在溶液中,或梯度或非线性流量(若存在多种))或这三种主要成分的更复杂或更简单的混合物,后一种是最

常见的。在通过激光的前向生物打印的现有技术中根本没有解决这些墨水的复杂性，特别是它们的不均匀。

[0010] 另外，现有技术已表明，生物墨水的粒子密度是高度随机的（胶状流体），因此导致许多粒子以统计方式转移到接收基板。

[0011] 在此背景下，现有技术的解决方案不允许根据特定特性选择具有精确成分（生化或生物材料粒子或物质）的生物墨水膜以转移到受体，恰当生物墨水成分与预定生物打印计划对应，该特定特性将其与膜中存在的构成生物墨水的成分区分开。

[0012] 在现有技术的解决方案中，激光与膜的被认为包含“盲”转移的不均匀的区域相互作用，该膜包含足够密度的可转移粒子（甚至接近饱和），以确保转移足够量的粒子。

[0013] 用包含新粒子的流体手动定期对膜重新进行填装，以便保持足够量的粒子，从而允许盲转移。可指出，这种问题对于所有生物打印工艺（尤其是喷墨和挤出）是十分常见的。

[0014] 本发明提供的解决方案

[0015] 作为序言，生物墨水的“不均匀”意味着，膜的任何区域在成分方面都有其自身的特性：粒子、生化物质（生长因子、生物分子、离子等）或生物材料。通常，术语“不均匀区域”、“组成的局部变化”、“特定组成区”被用作通用术语“不均匀”的同义词。

[0016] 为了应对这些缺点，本发明在最一般意义上涉及用于将生物墨水转移到目标物的设备，该设备包括：

[0017] -透明板，其限定用于异质流体膜的接收区域，所述异质流体膜包含多个粒子和/或多个生化物质和/或多个生物材料、或多个粒子和/或一种或更多种生物材料类型和/或一种或更多种生化物质和/或一种或更多种生化物种类型；

[0018] -激光源，其与受控制的偏转装置和用于聚焦在所述流体膜的平面中的光学单元关联以施加局部脉冲，其特征在于，所述设备还包括：

[0019] -用于对成像区域进行成像的装置，所述成像区域具有是所述生物墨水膜的不均匀的标称横截面的至少5倍大的成像截面；

[0020] -图像分析装置，其用于：

[0021] o识别所述膜中的不均匀的几何位置；

[0022] o借助表征手段（例如，光学成像、拉曼光谱或自动-荧光分析）并且通过时空分析装置（不均匀行为的个体和/或组的动力学等），对识别出的不均匀中的每个的可观察特性（大小、形状因子、粒子类型、粒子寿命、生物材料的密度和类型、分子等）进行识别；以及

[0023] -用于选择如此定位和表征的不均匀中的至少一个不均匀以及用于控制所述偏转装置以将激光束导向所述不均匀的位置并触发所述激光脉冲的装置。

[0024] 根据其变型中的一些：

[0025] -上部成像区域为 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ ；

[0026] -通过应用ROI（所关注的区域）可衡量成像区域；

[0027] -成像区域包括激光与流体膜相互作用的区域

[0028] -成像区域不同于例如2个不同的焦平面上或在同一焦平面的两个相邻区域上的激光与流体膜相互作用的区域。

[0029] -该设备包括本地计算机，本地计算机执行用于表征成像区域中存在的均匀的图像处理。

[0030] -该设备包括与远程计算机通信的装置,远程计算机执行用于表征成像区域中存在的不均匀的图像处理。

[0031] -表征装置包括以下元件中的一个或多个:单色或多色光学成像系统、拉曼光谱仪、红外线光谱仪或粒子和生物材料的内源自发荧光分析装置。

[0032] -膜包含悬浮或聚集的活细胞、原核或真核。

[0033] -膜包含一种或更多种生物材料,该生物材料可与一种或更多种类型的细胞以及与诸如生长因子或所确定的生物分子这样的生化物质混合。这种配置为创建非常复杂和异质的墨水开辟了道路,这些墨水可以被用作通过简化工艺并使其更快速更便宜来制成一定组织的“独特”墨水。那么,复杂性在于,本发明能够快速应对流体膜中存在的粒子、生物材料和/或化学物质的多个区域的定位和表征,以允许受控制地制造复杂且可定制的组织。

[0034] -该系统还可有利地结合连续的生物墨水重新填装装置,以确保高生产率,同时使得能够触及大范围的不均匀,以旨在满足预定义的生物打印计划。

[0035] 本发明还涉及一种用于将包含不均匀的生物墨水转移到目标物的方法,该方法包括:将透明板置于转移设备中,该透明板限定用于包含多个不均匀(粒子或生化或生物材料物质)的透明流体膜的接收区域;并且控制由与受控制的偏转装置关联的激光器发射的激光脉冲的定向和激活,以致使激光束与所述膜相互作用,其特征在于,所述方法还包括:

[0036] a) 所述膜中的具有成像横截面的区域的至少一个成像步骤,该成像横截面是不均匀的标称横截面的至少5倍大;

[0037] b) 至少一个图像分析步骤,用于识别所述不均匀的几何位置以及对识别出的不均匀中的每个的至少一个可观察特性(大小、形状因子、粒子类型、粒子寿命、生物材料的类型和密度、分子等)进行识别;以及

[0038] c) 选择如此定位和表征的所述不均匀中的一个不均匀的至少一个步骤;以及

[0039] d) 至少一个转移步骤,其包括控制所述偏转装置以将激光束导向所选择的不均匀的位置并且进行控制以触发激光脉冲。

[0040] 根据过程变型:

[0041] -它还包括成像、分析和表征步骤以及多个转移步骤,每个转移步骤对应于待转移的至少一个定位和表征的区域。

[0042] -它包括将成像、分析和表征步骤与转移步骤交替进行。

[0043] -它包括计算待转移区域有序序列的步骤。

[0044] -成像步骤涉及处理原始图像,以提取与待转移区域对应的简化图案。

[0045] -同时执行计算待转移的区域的位置和表征所述区域的步骤。

[0046] -通过基于在并行架构处理器上执行的算法进行处理来执行计算待转移的区域的位置的步骤和表征所述区域的步骤。

[0047] -它包括将转移之后的打印区域的图像与理论植入的图进行比较的附加步骤。

[0048] -它包括触发新转移以校正观察到的转移与理论植入之间的差异的附加步骤。

[0049] -所述膜包含活细胞,

[0050] -所述膜包含一种或更多种类型的生化物质,

[0051] -所述膜包含一种或更多种类型的生物材料,

[0052] -所述膜包含不同浓度的相同生物材料,

[0053] -该过程还可包括用于对生物墨水膜进行重新填装以连续或不连续地填充激光脉冲区域的装置。然后,生物墨水的不均匀必然在膜内运动,这意味着,使用适当的数据采集和处理手段来快速且可靠地表征生物墨水。这些手段可包括使用成像、光谱仪、物理-化学分析、在线测量等。

[0054] 出于本发明的目的,“不均匀”意指具有有机、矿物或活性成分的生物墨水的受关注区域,特别是:

[0055] -纳观粒子,诸如由细胞产生的外来体或其他囊泡,或生物材料(羟基磷灰石)的纳米粒子,或生物分子(生长因子)的纳米胶囊,

[0056] -微观粒子,诸如活细胞(真核细胞、干细胞、小球等)、生物材料的微粒、生物分子(生长因子)的微胶囊,

[0057] -介观粒子,诸如由细胞或生物材料簇组成的球状体。

[0058] 优选地,在生物打印的背景下,粒子被定义为诸如活细胞、外来体或生物分子这样的具有生物学性质的物体。

[0059] 然而,该设备和对应的过程不限于本发明的该定义。实际上,粒子也可以是非生物的(即,惰性的)并且由例如一种或更多种生物材料构成,这些生物材料的性质取决于目标应用。

附图说明

[0060] 将根据以下对本发明的描述清楚其他特征和优点,所述描述仅是参照附图作为示例给出的,在附图中:

[0061] -图1是根据本发明的设备的示意图。

[0062] -图2示出所获取图像的视图。

具体实施方式

[0063] 发明背景

[0064] 本发明是旨在3D重建人体组织的激光生物打印(LAB)领域的一部分。LAB原理包括聚焦激光以产生等离子体,该等离子体在由在液体介质中具有生物材料、生化物质和/或细胞悬浮物的溶液组成的生物墨水膜上被吸收。用该等离子体,在生物墨水中产生空泡。该空泡通过其流体动力学移动使生物墨水的自由表面变形,达到形成物质流的程度。该流的特性取决于大量的物理参数。通过该流(其包含少量细胞、生物材料或化学物质),出现材料以受控方式转移到接收基板。

[0065] 在该背景下,有必要根据特定图案/位置打印生物组织的构成以便得到:

[0066] -具有尽可能接近原生活体组织的性质(形状和功能)的2D/3D物体;或

[0067] -嵌合体,其允许复合/测试/模拟生物背景,以改善对外部试剂(活性剂)的组织形态发生或生物反应机制的理解。

[0068] 因此,结合细胞打印进行的生物材料打印也必须遵循非常特定的打印方案,以便为打印的细胞提供可行的环境,以便实现所请求的物品。总之,控制打印在接收基板上的细胞/生物材料/生化物质的数量和位置对于实现生物打印物品的必要和预期质量是必不可少的。

[0069] 本发明的目的是建立一种测量装置,该测量装置允许在打印之前识别/映射不均匀生物墨水中的特定成分的区域,并且因此触发激光以根据(在“受体”上的)待打印的区域和在对目标物品进行CAD期间设计的图案特定地瞄准所期望的成分区域。

[0070] 为此目的,本发明包括:

[0071] i) 对供体执行2D表征;

[0072] ii) 通过点对点(ad-hoc)数字处理来检测不均匀;

[0073] iii) 自动映射特定成分区域的位置;

[0074] iv) 将激光照射图案(打印轨迹)与特定供体成分的区域映射相匹配。

[0075] 在生物打印的背景下,特别是在开发新模型时,可暂时使用标记通过外部试剂(免疫标记、荧光等)标记细胞,以帮助表征打印物品。另一方面,当生产用于体外或体内应用的模型时,细胞必须一直完全保留免受任何外源性干扰,因为它们构成目标组织的构建块。因此,在这些情况下,它们不能被外部试剂标记。因此,细胞的检测在培养基中将相对复杂,因为它们的折射率十分接近水的折射率,水是这些介质的主要成分。因此,细胞成像已成为一个要解决的重要问题。

[0076] 另外,打印头的填充动力学或悬浮细胞的自然移动直接影响了细胞随时间推移的位置。这意味着,如果激光打印路径总是与其位置的映射一致,则以高频率重复检测其位置。这对于必须以高速操作的检测和映射装置具有直接后果(对于允许数据采集的硬件部分和允许数据处理的软件部分二者)。

[0077] 因此,本发明旨在解决的问题是多方面的:

[0078] -检测难以可视化的生物墨水成分(不均匀)的局部变化(成像手段+图像处理);

[0079] -映射不均匀(允许被给予其数量和供体中位置的图像处理);

[0080] -对应于映射执行激光照射(实时调整打印轨迹)。

[0081] 根据变型,本发明还旨在涵盖非常有趣的细胞分选情况:

[0082] -能够区分活细胞与死细胞,以便仅打印活细胞;

[0083] -能够将两种细胞类型区分开,这两种细胞类型在同一墨水中混合(通过共培养或不共培养自主进行的);

[0084] -能够区分类型相同但有高度差异的细胞(干细胞,不同的分化/成熟度);

[0085] -能够区分观察区域中存在的和自主或不自主生成的同一生物材料的浓度区域;

[0086] -能够区分混合在同一生物墨水中的不同生物材料。

[0087] 在性能水平上,本发明的目的“目标射击”功能必须允许:

[0088] -打印过程的简化(打印单元的数量与生物墨水中存在的细胞的数量的比率),也被称为“打印产量”。这使在该过程中未使用的细胞数量最小化。

[0089] -通过基于空间存在的细胞数量选择激光照射区域来优化过程(无需使用多次激光照射来打印同一区域)。这意味着,优化打印路径以使激光照射的数量最小化,因此使细胞应力最小化。

[0090] -由于激光发射的效率(也被称为“打印速率”),加速过程(如有需要)。

[0091] -使该过程与连续重新填装筒兼容,因为“目标照射”方法必须允许在任何时间都测量生物墨水中的流动将相对高的细胞位移。

[0092] 关键点还包括:

[0093] -由于掌握了“打印产量”，允许少量或稀少量地打印细胞。对于可用细胞数量非常低的某些药物、化妆品或临床应用而言，这是非常重要的一点。

[0094] -通过根据空间存在的细胞数量控制激光发射区域的选择，允许非常高级地定制组织模型。因此，通过目标物-照射 (Target-Shot) 辅助的高分辨率和高精度的激光过程，可以在广泛的市场和应用中响应对实验室或制造商开发定制的组织的要求。

[0095] -由于通过目标物-照射 (Target-Shoot) 功能确保的激光照射的系统效率加速过程（“打印速率”），实现过程的工业化和生产率的提高。

[0096] -使技术的利用更加容易，因为将用连续灌装筒优化和自动化进行生物墨水处理。

[0097] -控制在生物打印过程（激光预打印/激光打印后比较）期间的任何时间转移的粒子的数量，以确保打印图案与CAD设计的图案之间良好匹配。

[0098] -通过集成单个筒（或数量减少的筒）来降低生物打印装置的成本，将在转移时进行分选的不同组织成分将被放置在该筒中。潜在地，降低成本甚至可为单次使用筒的定义创造条件，这对于在临床领域中使用生物打印将是大有裨益的。

[0099] 设备的描述

[0100] 它包括相机1，相机1由例如1800万像素的高清传感器组成。例如，相机1是由IDS公司以参考“USB 3uEye CP”销售的传感器。

[0101] 该相机1与作为场镜的第二图像合成光学单元2关联，从而确保在膜3的焦平面与相机传感器1的焦平面之间的图像组合。

[0102] 膜3被置于目标物11的前方，当触发激光脉冲时，细胞或粒子被转移到目标物11。

[0103] 例如，第二图像合成光学单元2包括透镜，该透镜优选地是远心的，该透镜包括在可见光范围内优化的至少2个透镜。

[0104] 光路由高通二向色镜4反射，高通二向色镜4透射红外线（对应于激光器5的发射波长）并反射可见光范围内的波长。

[0105] 该设备还包括与整形光学器件7关联的在可见光范围内发光的光源6，整形光学器件7的功能是在必要时（例如，当光源偏离发射光束时）准直光源6。该光源可以是单个LED光源、由LED阵列组成的部件、或诸如白炽灯、卤素灯、超连续激光器等这样的白光源。它还可以由窄光谱源（通过所使用的技术的真实技术或利用滤光器）组成，窄光谱源以允许荧光激励标记或粒子的波长发光。

[0106] 分离器板8用于叠加照明光路和观察光路。

[0107] 在二向色镜4的出口处，朝向扫描仪的两个光束（照明和激光）彼此共线，并且实际上也与从膜返回的成像光束共线。因此，三个光束在二向色镜4和墨水膜3之间是共线的。

[0108] 它们被扫描仪9偏转，从而确保受外部计算机控制的定向。

[0109] 扫描仪9沿着两个垂直轴提供了以上提到的三个共线光束的角定向，在包含生物墨水的供体上扫描三个共线光束中的2个光束，而最后一个光束被“偏转”到朝向成像系统的准直成像光束。它例如由由电磁致动器驱动的两个镜组成，例如，由SCANLAB（商标名）公司以参考“SCANcube 14”销售的扫描仪。

[0110] 因此，三个观察、照明和激光束是共线的并且在扫描仪9的出口处以相同的方向定向。因此，观察方向和照明方向遵循激光束的定向。

[0111] 光学单元10的功能是：

- [0112] a) 将角定向转换成沿着膜3的平面中的两个轴X、Y的横向定位/位移;
- [0113] b) 将激光束和照明光束聚焦在膜3的同一平面中;以及
- [0114] c) 收集被膜3反射的可见光范围中的光,以通过相机1构造观察图像。
- [0115] 光学单元10由形成远心透镜的一组镜头组成,该远心透镜具有以下特征:
- [0116] 在红外光谱中,透镜的表面经过抗反射涂层处理,以支持高激光能量。这防止了第一光学单元10随时间推移的劣化,第一光学单元10的设计被计算为防止在所述第一光学单元10内形成激光“热点”。
- [0117] 当脉冲被触发时,二向色镜4防止激光红外辐射返回相机1。可选地,红外线阻断滤光器也可被置于二向色滤光器4和相机1之间的光路中。
- [0118] 确定第二光学单元2的焦距与透镜10的焦距的比率,以在相机1的平面中提供其最小观察物体的尺寸大于1个像素的图像。
- [0119] 该设备还包括从相机1接收数据的计算机12和观察目标物11的第二相机13。该计算机12还控制扫描仪9和激光器5。
- [0120] 操作
- [0121] 计算机12运行计算机程序,以执行不同的处理任务:
- [0122] -对来自相机1的原始图像进行预处理;
- [0123] -对在以上提到的预处理期间识别的粒子的进行定位和表征处理;
- [0124] -对扫描仪9和激光器5进行控制处理以使激光的照射与粒子的位置匹配;
- [0125] -可选地,对来自观察目标物11的相机13的原始图像进行处理。
- [0126] 对来自相机的原始图像进行预处理
- [0127] 可周期性地执行该预处理,以在激光触发序列被接合之前或者在两个连续的触发序列之间记录膜3的映射。
- [0128] 第一种解决方案特别适用于膜承载稳定粒子的情形,既依据粒子在膜平面中的位置,又依据它们的发展。这涉及例如相对于基板的反应不是非常强的矿物或有机粒子。
- [0129] 第二种解决方案更适用于粒子具有移动性和可称量的情形。例如,这是诸如细胞这样的活体粒子的情况,活体粒子可在膜中移动,有强烈的聚集倾向,这将明显依赖于细胞和所使用介质的类型。
- [0130] 在这两种情况下,处理包括例如通过分割、形状识别或轮廓和重心识别技术从与对应于所关注粒子的图形物品的检测对应的原始图像中提取信息。
- [0131] 可使用Watershed, Meyer的泛洪算法或最佳生成森林算法阈值技术执行该映射。
- [0132] 该处理可被分为几个阶段:
- [0133] -原始图像的恢复或调节阶段(噪声抑制、去模糊、非均匀照明的校正);
- [0134] -分割阶段;
- [0135] -特征提取阶段;以及
- [0136] -数据分析阶段。
- [0137] 该处理为所识别的每个图形物品指派ID±标识符和膜平面中笛卡尔坐标形式的位置。
- [0138] 图2示出了基于由相机1捕获的原始图像20的图像序列以及示出图像场中存在多个粒子的放大区域21。

[0139] 如图像22中所示,以已知方式使用阈值处理来计算直方图形式的对比度变化。该直方图允许通过使用阈值算法来计算对比图像23。

[0140] 该对比图像23用于计算质心(图像24)和轮廓(图像25)。

[0141] 该信息使得能够构建经处理的每个图形物品的标识符以及这些物品中的每个的中心的坐标的表26。

[0142] 表征处理包括根据所识别和定位的图形物品与由诸如以下这些物理参数预定义的族的从属关系向它们中的每个指派属性:

[0143] -物品的大小等级;

[0144] -对特定照明(例如,光致发光)的反应;

[0145] -光谱特性;

[0146] -轮廓的类型(形状、规律性等);

[0147] -与物品集合的从属关系;

[0148] -物品的光学密度;

[0149] -聚合的密度(估计的聚合物品的数量);

[0150] -时空动力学。

[0151] 这些参数当然不是限制性的。

[0152] 该处理的结果通过在每个标识符中添加关于与一个或更多个系列的等级的从属关系的信息完成以上的表。

[0153] 优选地,并行进行并且在诸如GPU这样的并行架构处理器上运行处理。

[0154] 然后,使用该信息将因此执行的映射与先前记录的目标映射匹配,以便在计算机12的控制下计算激光照射的序列从而导致计算扫描仪定向,然后触发激光脉冲。序列的计算考虑了通过诸如“resolution of the commercial traveller’s optimization problem or of the NP-complete problem(商业旅行者的优化问题或NP完全问题的解决方案)”这样的已知算法来计算全局处理时间的减少。

[0155] 在每次激光照射之后或者在一系列激光照射之后,计算机通过将观察目标物11的相机13所发送的图像与预先登记的目标映射进行比较来检查转移的一致性。计算器执行最大似然计算,并且在出现差异(缺少打印物品)的情况下,重新计算以下激光照射的序列以校正观察到的异常。它还可用于校正相对于目标映射有太多打印物品的区域。该校正是通常通过传统抽吸装置完成的,该抽吸装置允许非常精确地去除少量材料。该抽吸是由计算机12控制的。在任何情况下,这里的控制意味着,在预先记录的目标映射和实际打印的目标物11之间安装控制回路,这必须使得在两个映射之间获得尽可能接近100%的最大似然成为可能。

[0156] 此外,本发明不限于单个激光打印过程。它涵盖了多头打印(多个膜3与一个或更多个激光器同时使用),为此必须使成像装置及其关联处理能够同时处理多个区域,以保证有可能同时“多色”打印(在单个过程中打印几种不同的细胞类型)。

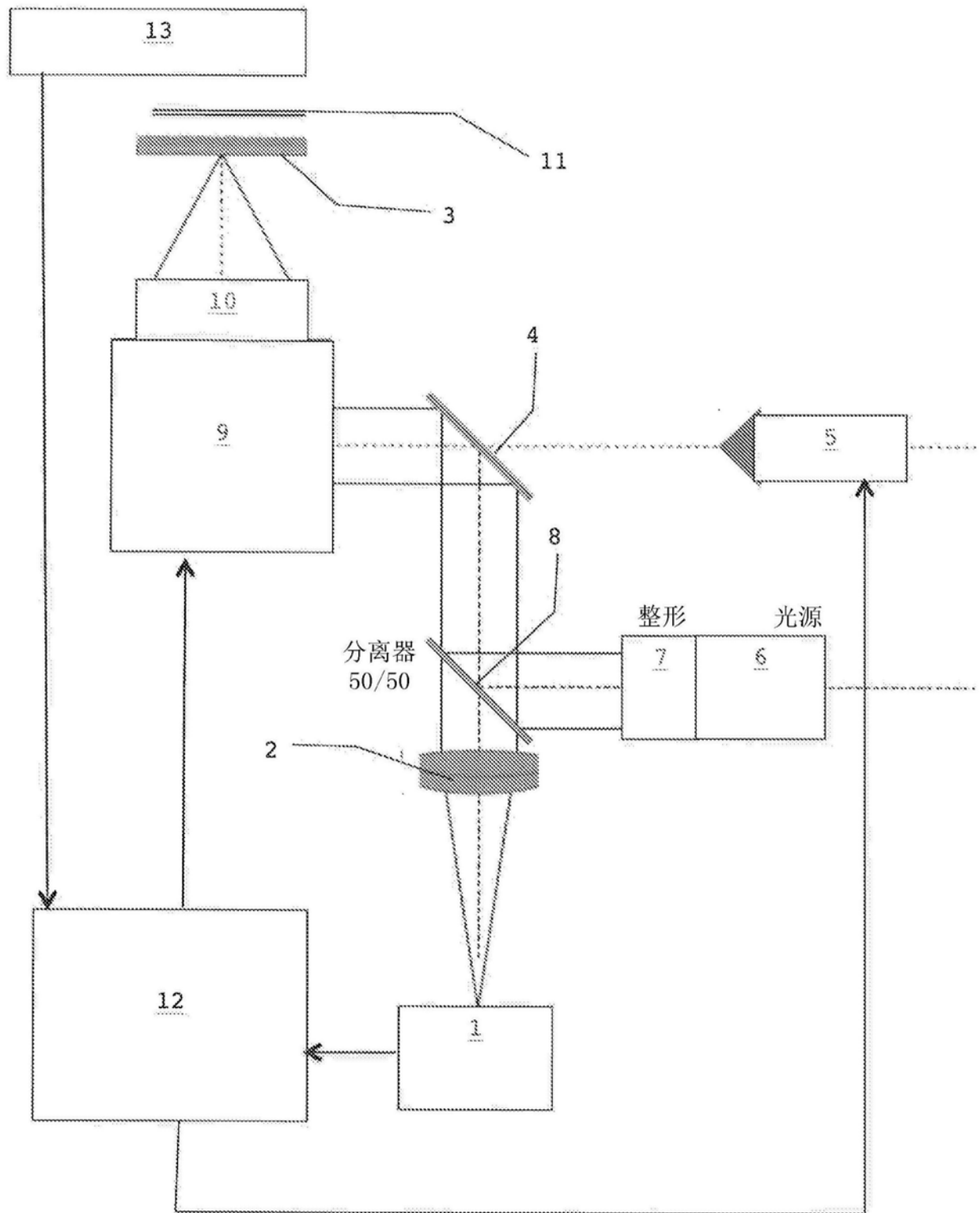


图1

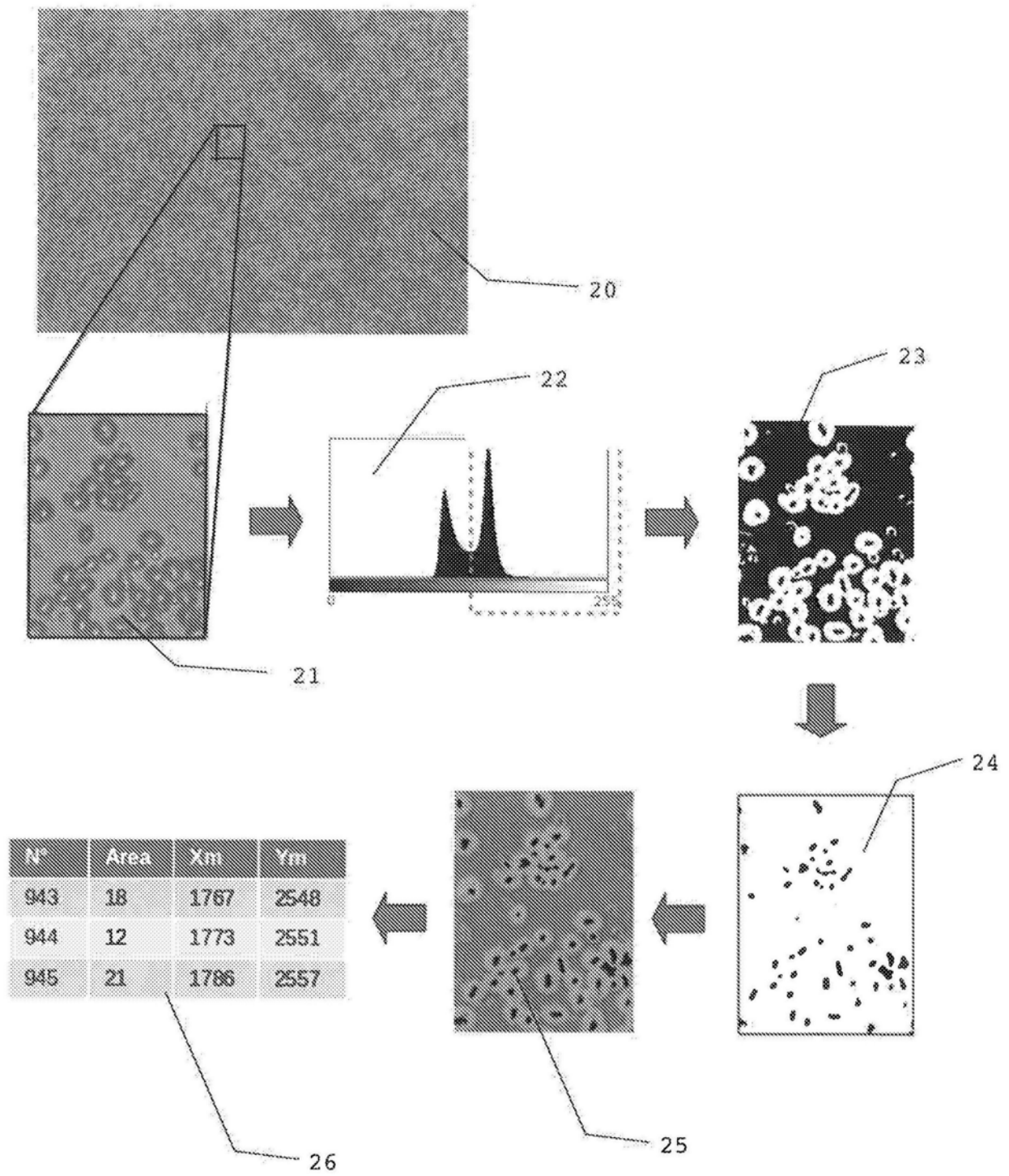


图2