



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109072304 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780022654.6

(22)申请日 2017.04.11

(30)优先权数据

10201602855P 2016.04.11 SG

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2017/050206 2017.04.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/180061 EN 2017.10.19

(71)申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡

(72)发明人 D·金克

N·F·B·阿克巴·侯赛因

L·H·洛 A·W·林

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 康健 王思琪

(51)Int.Cl.

G12Q 1/6883(2018.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G06T 7/00(2017.01)

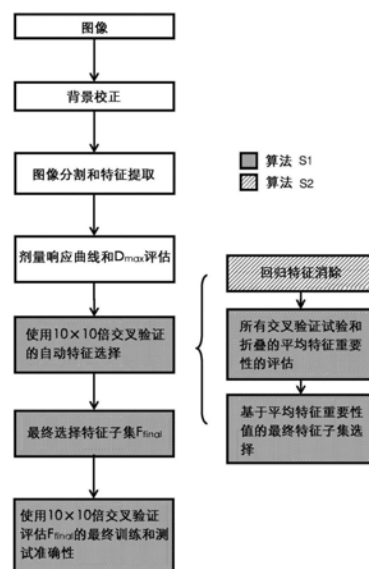
权利要求书3页 说明书12页 附图8页

(54)发明名称

用于准确预测化合物诱导的肝损伤的高通量法

(57)摘要

提供了一种用于预测由测试化合物对肝细胞的损伤而导致的体内肝损伤的方法和系统。该方法包括获取从细胞培养物获得的荧光染色细胞的图像,其中该细胞已经用剂量范围的至少所述测试化合物及其载体处理。所述细胞可以是肝细胞,包括原代或永生化肝细胞、肝癌细胞或诱导多能干细胞来源的肝细胞样细胞。获取的图像被分割。该方法还包括从分割图像中提取和分析一个或多个表型特征,其中所述一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组,由在分割图像中的(a)DNA特征、(b)RELA(NF- κ B p65)的特征、和(c)肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征和d)细胞器及其子结构的特征组成。最后,该方法包括将处理的样品的结果归一化至载体对照,并使用机器学习方法基于测试化合物诱导的归一化的所提取和选择的表型特征变化来预测测试化合物对肝损伤的概率。



1. 一种用于预测由测试化合物诱导的肝损伤的方法,包括:
获取从细胞培养物中获得的荧光染色细胞的图像,其中所述细胞已经用剂量范围的至少所述测试化合物及其载体处理;
分割获取的图像;
从分割图像中提取和分析一个或多个表型特征,其中所述一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组,由在所述分割图像中的(a) DNA特征、(b) RELA (NF- κ B p65)特征、(c) 肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征和d) 细胞器及其子结构的特征组成;
将处理的样品的结果归一化至载体对照;以及
使用机器学习方法基于测试化合物诱导的所提取和选择的表型特征的归一化变化来预测所述测试化合物对肝损伤的概率。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,从所述分割图像中提取和选择所述一个或多个表型特征包括提取和选择在所述分割图像中的染色体区域处的DNA标记的强度的变异系数。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,从所述分割图像中提取和选择所述一个或多个表型特征包括提取和选择在分割图像中的核区域处从灰度共生矩阵 (GLCM) 确定的DNA标记的强度的求和均值的平均值。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中,从所述分割图像中提取和选择所述一个或多个表型特征包括提取和选择所述分割图像中的染色体区域处的RELA标记的强度的平均值。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,从所述分割图像中提取和选择所述一个或多个表型特征包括提取和选择基于所述分割图像中的核区域处的RELA标记的对象强度的一部分。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述细胞选自包括肝细胞、诱导的多能干细胞 (iPS) 来源的肝细胞样细胞、原代肝细胞、(永生化的) 肝细胞细胞系和肝癌细胞的组。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述肝细胞来源于肝前体细胞样细胞。
8. 根据权利要求6和7所述的方法,其中,所述细胞是人类细胞。
9. 根据权利要求6和7所述的方法,其中,所述细胞是动物细胞。
10. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述肝细胞是HepaRGTM细胞。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,所述细胞培养物的细胞在2D培养中培养。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,还包括荧光标记所述细胞以检测DNA、RELA (NF- κ B p65)、F-肌动蛋白、 γ H2AX和全细胞中的一种或多种的步骤。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,处理所述细胞包括用至少一种测试化合物和载体处理至少12小时或过夜的预定持续时间。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中,处理所述细胞包括用至少一种测试化合物和载体处理16小时或更长的预定持续时间。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中,预测肝毒性包括:
用剂量范围的至少一种测试化合物和载体处理所述细胞;
确定关于表型特征的最大响应值 ($\Delta_{\max}$); 以及
使用机器学习方法基于所述化合物诱导的特征变化预测肝毒性。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中,使用机器学习方法来预测肝毒性包括使用机器学习方法,所述机器学习方法使用所述细胞的所选择并归一化的表型特征变化的最大响应

值($\Delta_{\max}$)的中值,用于化合物分类。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述最大响应值包括在所述测试化合物的浓度为1mM、2mM或5mM时的响应值。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中预测肝毒性包括:

当测试多于一种测试化合物时,将不同测试化合物的表型特征归一化至相同范围;以及

通过使用机器学习分类算法预测肝毒性,所述机器学习分类算法已经被用训练组化合物训练,所述训练组化合物在统计学上独立于测试组化合物。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中,所述机器学习分类算法是随机森林算法。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中,所述机器学习分类算法是支持向量机。

21. 一种用于预测由至少一种测试化合物诱导的肝损伤的系统,包括:

用于用至少一种测试化合物及其载体处理细胞培养物并染色所述细胞培养物以用于荧光检测的设备;

相对于所述设备布置以获取用于检测细胞及其染色成分的荧光染色细胞的图像的成像装置;和

连接到成像装置用于接收和分割所获取的图像的计算装置,所述计算装置包括用于从所述分割图像中提取和分析一个或多个表型特征的特征提取模块,其中所述一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组,由在分割图像中的(a) DNA特征、(b) RELA (NF- κ B p65) 特征、和(c) 肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征和d) 细胞器及其子结构的特征组成;所述计算装置还包括预测模块,用于将处理的样品的结果归一化至载体对照并使用机器学习方法基于测试化合物诱导的归一化的所提取和选择的表型特征变化预测所述测试化合物对肝损伤的概率。

22. 根据权利要求21所述的系统,其中,所述特征提取模块从所述分割图像中提取并选择表型特征,测量所述分割图像中的染色体区域处的DNA标记物的强度的变异系数。

23. 根据权利要求21所述的系统,其中,所述特征提取模块从所述分割图像中提取并选择表型特征,测量所述分割图像中的核区域处从灰度共生矩阵 (GLCM) 确定的DNA标记的强度的求和均值的平均值。

24. 根据权利要求21所述的系统,其中,所述特征提取模块从所述分割图像中提取并选择表型特征,测量所述分割图像中的染色体区域处的RELA标记的强度的平均值。

25. 根据权利要求21所述的系统,其中,所述特征提取模块从所述分割图像中提取和选择表型特征,测量基于所述分割图像中的核区域处的RELA标记的对象强度的一部分。

26. 根据权利要求22至25中任一项所述的系统,其中,所述计算装置的预测模块通过使用机器学习方法基于相对于用所述至少一种测试化合物和载体处理的细胞的表型特征变化的最大响应值($\Delta_{\max}$)来预测肝毒性。

27. 根据权利要求26所述的系统,其中,所述计算装置的预测模块通过使用机器学习方法来预测肝毒性,所述机器学习方法使用所选择并归一化的表型特征变化的最大响应值($\Delta_{\max}$)的中值

28. 根据权利要求26所述的系统,其中,所述最大响应值包括在所述测试化合物的化合物浓度为1mM、2mM或5mM时的响应值。

29. 根据权利要求23-28中任一项所述的系统, 其中, 所述计算装置的预测模块基于当使用多于一种测试化合物时归一化至相同范围的表型特征变化并通过使用统计学上独立的训练组化合物训练的机器学习分类算法预测肝毒性。

30. 根据权利要求29所述的系统, 其中, 所述机器学习分类算法是随机森林算法。

31. 根据权利要求29所述的系统, 其中, 所述机器学习分类算法是支持向量机。

用于准确预测化合物诱导的肝损伤的高通量法

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求2016年4月11日提交的新加坡专利申请No.10201602855P的优先权。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及化合物诱导的肝毒性,更具体地说,涉及用于基于体内肝细胞损伤准确预测化合物诱导的肝损伤的高通量方法和系统。

背景技术

[0004] 肝脏是针对化合物诱导的毒性的主要人类靶器官。损害肝脏的化合物包括药物、草药(herbal)和真菌化合物、食品和化妆品成分、膳食补充剂、工业化学品和环境毒物。因此,化学、食品和营养、化妆品和消费者保健和制药工业必须解决化合物诱导的肝毒性。

[0005] 药物诱导的肝损伤是需要器官移植的急性肝衰竭的主要原因。啮齿动物和非啮齿动物物种组合的调节性动物毒性研究仅确定了约50%化合物在人类中具有肝毒性。目前临床前肝毒性模型的低灵敏度是发展晚期阶段的磨耗(attrition)的主要原因之一,也是药物由于先前未检测到的肝毒性而继续被从市场上撤出的原因之一。

[0006] 化妆品工业也需要针对预测肝毒性的改进平台,其中特别需要无动物预测平台。由于动物试验禁令,在欧洲、挪威、以色列和印度动物模型不能再用于开发或销售化妆品的测试。预计新西兰、加拿大、台湾、巴西、韩国以及可能阿根廷、美国和中国也将效仿。

[0007] 此外,食品行业目前经受动物维权组织的巨大压力。在这种压力下,像可口可乐这样的大型食品公司已停止使用动物试验,最近的一家已经屈服这种压力的食品公司是龟甲万株式会社。因此,迫切需要用于准确预测人肝毒性和其他毒性的无动物平台。对于肝脏、肾脏和其他器官,不存在已接受的体外模型或计算机模拟(in silico)。

[0008] 因此,需要用于化合物诱导的肝损伤的高通量体外建模的方法和系统,其提供对这种化合物诱导的肝损伤的准确预测。还需要基于高通量筛选的方法和系统,其具有高度可扩展性并且适合于以工业规模测试大型化合物库。此外,结合附图和本公开的背景技术,从随后的详细描述和所附权利要求来看,其他期望的特征和特性将变得显而易见。

发明内容

[0009] 在一个方面,提供了用于预测由测试化合物诱导的肝损伤的方法,包括:获取从细胞培养物获得的荧光染色细胞的图像,其中所述细胞已经用剂量范围的至少所述测试化合物和其载体处理;分割获取的图像;从分割图像中提取和分析一个或多个表型特征,其中一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组,由分割图像中的(a) DNA特征、(b) RELA (NF- κ B p65) 特征、(c) 肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征和d) 细胞器及其子结构的特征组成;将处理的样品的结果归一化至载体对照;以及使用机器学习方法基于测试化合物诱导的归一化的所提取和选择的表型特征变化来预测测试化合物对肝损伤的概率。

[0010] 在一个实施方案中,从分割图像中提取和选择一种或多种表型特征可以包括提取

和选择分割图像中染色体区域处的DNA标记强度的变异系数。

[0011] 在一个实施方案中,从分割图像中提取和选择一个或多个表型特征可以包括提取和选择在分割图像中的核区域处从灰度共生矩阵 (GLCM) 确定的DNA标记的强度的平均值。

[0012] 在一个实施方案中,从分割图像中提取和选择一个或多个表型特征可以包括提取和选择分割图像中染色体区域处的RELA标记的强度的平均值。

[0013] 在一个实施方案中,从分割图像中提取和选择一个或多个表型特征可以包括提取和选择基于分割图像中的核区域处的RELA标记的对象强度的一部分。

[0014] 在一个实施方案中,细胞可选自包括肝细胞、诱导的多能干细胞 (iPS) 来源的肝细胞样细胞、原代肝细胞、(永生化的) 肝细胞细胞系和肝癌细胞的组。

[0015] 在一个实施方案中,肝细胞可以来源于肝前体细胞样细胞。

[0016] 在一个实施方案中,细胞是人类细胞。在另一个实施方案中,细胞是动物细胞。

[0017] 在一个实施方案中,肝细胞可以是HepaRG™细胞。

[0018] 在一个实施方案中,细胞培养物的细胞可以在2D培养 (culture) 中培养。

[0019] 在一个实施方案中,可以进一步包括荧光标记细胞以检测DNA、RELA (NF- κ B p65)、F-肌动蛋白、 γ H2AX和全细胞中的一种或多种的步骤。

[0020] 在一个实施方案中,处理细胞可包括用至少一种测试化合物和载体处理至少12小时或过夜的预定持续时间。

[0021] 在一个实施方案中,处理细胞可以包括用至少一种测试化合物和载体处理16小时或更长的预定持续时间。

[0022] 在一个实施方案中,预测肝毒性可以包括:用剂量范围的至少一种测试化合物和载体处理细胞;确定关于表型特征的最大响应值 ($\Delta_{\max}$);以及使用机器学习方法根据化合物诱导的特征变化预测肝毒性。

[0023] 在一个实施方案中,使用机器学习方法来预测肝毒性可以包括使用机器学习方法,所述机器学习方法使用所选择并归一化的细胞的表型特征变化的最大响应值 ($\Delta_{\max}$) 的中值,用于化合物分类。

[0024] 在一个实施方案中,最大响应值可包括测试化合物的浓度为1mM、2mM或5mM时的响应值。

[0025] 在一个实施方案中,预测肝毒性可以包括:当测试多于一种测试化合物时将不同测试化合物的表型特征归一化至相同范围;以及通过使用机器学习分类算法预测肝毒性,所述机器学习分类算法法已经被用训练组化合物训练,所述训练组化合物在统计学上独立于测试组化合物。

[0026] 在一个实施方案中,机器学习分类算法可以是随机森林算法或支持向量机。

[0027] 另一方面,提供了预测由至少一种测试化合物诱导的肝损伤的系统,包括:用于用至少一种测试化合物及其载体处理细胞培养物并染色细胞培养物以用于荧光检测的设备;相对于该设备布置以获取用于检测细胞及其染色成分的荧光染色细胞的图像的成像装置;以及连接到所述成像装置的用于接收和分割所获取的图像的计算装置,所述计算装置包括用于从所述分割图像中提取和分析一个或多个表型特征的特征提取模块,其中所述一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组,由在分割图像中的 (a) DNA特征、(b)

RELA (NF- κ B p65) 特征、和 (c) 肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征和 (d) 细胞器及其子结构的特征组成, 所述计算装置还包括预测模块, 用于将处理的样品的结果归一化至载体对照, 并使用机器学习方法基于测试化合物诱导的归一化的所提取和选择的表型特征变化预测测试化合物对肝损伤的概率。

[0028] 在一个实施方案中, 特征提取模块可以从分割图像中提取并选择表型特征, 测量分割图像中染色体区域处的DNA标记的强度的变异系数。

[0029] 在一个实施方案中, 特征提取模块可以从分割图像中提取并选择表型特征, 测量分割图像中的核区域处从灰度共生矩阵 (GLCM) 确定的DNA标记物的强度的求和均值的平均值。

[0030] 在一个实施方案中, 特征提取模块可以从分割图像中提取并选择表型特征, 测量分割图像中染色体区域处的RELA标记的强度的平均值。

[0031] 在一个实施方案中, 特征提取模块可以从分割图像中提取并选择表型特征, 测量基于分割图像中的核区域处的RELA标记的对象强度的一部分。

[0032] 在一个实施方案中, 计算装置的预测模块可以通过使用机器学习方法基于相对于用至少一种测试化合物和载体处理的细胞的表型特征变化的最大响应值 ($\Delta_{\max}$) 来预测肝毒性。

[0033] 在一个实施方案中, 计算装置的预测模块可以通过使用机器学习方法来预测肝毒性, 所述机器学习方法使用所选择且归一化的表型特征变化的最大响应值 ($\Delta_{\max}$) 的中值。

[0034] 在一个实施方案中, 最大响应值可包括在测试化合物的化合物浓度为1mM、2mM或5mM时的响应值。

[0035] 在一个实施方案中, 计算装置的预测模块可以基于当使用多于一种测试化合物时归一化至相同范围的表型特征变化并且通过使用统计学上独立的训练组化合物训练的机器学习分类算法来预测肝毒性。

[0036] 在一个实施方案中, 机器学习分类算法可以是随机森林算法或支持向量机。

[0037] 根据本发明的至少一个实施方案, 提供了预测由于测试化合物对肝细胞的损伤导致的体内肝损伤的方法。该方法包括获取从细胞培养物获得的荧光染色细胞的图像, 其中所述细胞已经用剂量范围的至少所述测试化合物及其载体处理并分割所获取的图像。该方法还包括从分割图像中提取和分析一个或多个表型特征, 其中一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组, 由分割图像中的 (a) DNA特征、(b)、RELA (NF- κ B p65) 特征、(c) 肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征、和 (d) 细胞器及其子结构的特征组成。最后, 该方法包括将处理的样品的结果归一化至载体对照, 并使用机器学习方法基于测试化合物诱导的归一化的表型特征变化来预测测试化合物对肝损伤的概率。

[0038] 根据本发明的另一个实施方案, 提供了用于预测由于至少一种测试化合物对肝细胞的损伤导致的体内肝损伤的系统。该系统包括用于用至少一种测试化合物及其载体处理细胞培养物并染色所述细胞以用于荧光检测的设备、成像装置和计算装置。所述成像装置相对于所述设备布置, 以获取用于检测细胞及其染色成分的荧光染色细胞的图像。所述计算装置连接到成像装置, 用于接收和分割所获取的图像。所述计算装置包括用于从分割图像中提取和分析一个或多个表型特征的特征提取模块, 其中一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组, 由分割图像中的 (a) DNA特征、(b) RELA (NF- κ B p65) 特征、

(c) 肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征、和 (d) 细胞器及其子结构的特征组成。所述计算装置还包括预测模块, 用于将处理的样品的结果归一化至载体对照, 并使用机器学习方法基于测试化合物诱导的归一化的表型特征变化来预测测试化合物对肝损伤的概率。

[0039] 附图的简要说明

[0040] 附图中, 相同的附图标记在各个视图中指代相同或功能相似的元件, 并且与下面的详细描述一起被并入并形成说明书的一部分, 用于说明各种实施方案并用于解释根据本实施方案的各种原理和优点。

[0041] 图1描绘了根据本实施方案的用于预测肝损伤的系统的框图, 所述肝损伤由至少一种测试化合物诱导。

[0042] 图2描绘了由图1的系统的计算装置使用的成像和数据分析方法的流程图, 图1的系统用于根据本实施方案的用于准确预测化合物诱导的肝损伤的高通量体外建模。

[0043] 图3包括图3A至3F, 描绘了根据本实施方案通过核和NF- κ B染色用不同化合物获得的示例性免疫荧光图像数据。

[0044] 图4描绘了参考化合物信息表, 该参考化合物信息表用于根据本实施方案的用于准确预测化合物诱导的对HepaRG细胞的损伤的高通量方法的验证。

[0045] 图5描绘了根据本实施方案的对HepaRG细胞的表型特征组及其预测性能的表格。

[0046] 图6描绘了参考化合物信息表, 该参考化合物信息表用于根据本实施方案的用于准确预测化合物诱导的对诱导多能干细胞 (iPS) 来源的肝细胞样细胞的损伤的高通量方法的预验证。

[0047] 图7显示了说明由体内损伤肝细胞的化合物诱导的iPS来源的肝细胞样细胞的表型变化的图像数据。

[0048] 本领域技术人员将理解, 附图中的要素是为了简单和清楚而示出的, 不一定按比例描绘。

[0049] 详细说明

[0050] 以下详细描述本质上仅是示例性的, 并不意图限制本发明或本发明的应用和用途。此外, 没有意图受到在本发明的前述背景技术或以下详细描述中呈现的任何理论的约束。在以下描述中, 肝脏是动物的肝脏, 例如非人类哺乳动物和人类, 包括但不限于归类为牛、猪、马、犬、狼、猫、鼠、绵羊、禽类、鱼、山羊、乌鸦、acrine或delphine的动物。在一个实例中, 肝脏是人肝脏。本实施方案的目的是提供用于准确预测体内肝细胞毒性的高通量系统和方法, 其通过利用机器学习的表型分析结果分类将肝细胞的自动成像与图像数据的自动计算分析相结合。

[0051] 与确定化合物对培养的肝细胞的毒性的常规系统和方法不同, 根据本实施方案的系统和方法检查体外培养细胞中诱导的变化并使用那些观察到的变化来预测体内肝细胞毒性。

[0052] 使用HepaRGTM细胞获得最佳结果, HepaRGTM细胞是最有希望的肝细胞模型之一。HepaRGTM细胞系是能够分化成两种不同细胞表型 (即胆汁样细胞和肝细胞样细胞) 的人双能祖细胞系。该细胞系由与慢性丙型肝炎相关的肝肿瘤建立。HepRG细胞表现出原代人肝细胞的许多特征, 包括关键代谢酶、核受体和药物转运蛋白的形态和表达。与HepG2和Fa2N-4细胞不同, HepaRG细胞具有高P450活性和所有核受体的完全表达。iPS来源的人肝细胞样细

胞、原代人肝细胞和其他人肝细胞细胞系也可能是合适的。

[0053] 参考图1,方框图100描绘了根据本实施方案的用于预测肝损伤的系统。系统100包括细胞培养和染色装置110。在细胞培养和染色装置110内,用测试化合物和载体处理细胞培养物以化合物暴露16小时或更长时间。在化合物处理后,对处理的细胞进行染色以进行荧光检测,从而各种细胞组分(DNA,RELA(NF- κ B p65)和F-肌动蛋白)和全细胞被荧光标记。因此,根据本实施方案,人肝细胞在细胞培养和染色装置110的胶原包被的标准多孔板中被培养为二维(2D)单层。虽然目前使用HepaRG细胞,但是根据本实施方案,原代人肝细胞、iPS来源的肝细胞样细胞和其他类型的肝细胞或肝细胞样细胞可能是合适的。

[0054] 成像装置120相对于细胞培养和染色装置110光学地布置,以获取用于检测细胞及其染色成分的荧光染色细胞的图像。成像装置120是高含量分析仪,其自动成像荧光染色的细胞以获得化合物处理后的RELA(NF- κ B p65)、F-肌动蛋白、 γ H2AX和4',6-二脒基-2-苯基吲哚的免疫荧光检测(DAPI、DNA检测)和全细胞染色(WCS)检测。

[0055] 成像装置120将获取的图像提供给计算装置130,计算装置130连接到成像装置120以接收和分割所获取的图像。计算装置130通过表型分析来分析表型特征,并使用机器学习方法进行结果分类和预测性能分析。

[0056] 计算装置130包括特征提取模块132,其从分割图像中提取一个或多个表型特征。根据本实施方案,通过特征提取模块132提取表型特征,所述表型特征选自包括(a)分割图像中的染色体或核区域处的DNA标记的强度或纹理特征和(b)分段图像中染色体或核区域处的RELA标记的强度或比率特征的表型特征的组。计算装置130还包括连接到特征提取模块132的预测模块134,其使用提取的表型特征来预测肝损伤。更具体地,根据本实施方案,预测模块134使用使用表型特征开发的监督分类器预测体内肝细胞毒性。本实施方案的系统有利地提供高预测性,测试灵敏度为61.4%,测试特异性为86.1%,测试平衡准确度为73.8%,结果显著优于传统方法和系统。

[0057] 参考图2,流程图200描绘了根据本实施方案的由计算装置130使用的成像和数据分析方法,该方法用于体内化合物诱导的肝细胞损伤的高通量预测。计算装置130接收图像202并执行背景校正204以改进图像的清晰度,为由特征提取模块132进行的图像分割和特征提取206做准备。预测模块在对经处理的图像执行自动特征选择210之前执行剂量响应曲线拟合和 $\Delta_{\max}$ 评估过程208。

[0058] 根据本实施方案的自动特征选择210包括两种新方法:递归特征消除算法212和特征选择算法。特征选择算法在递归特征消除算法212之后执行,并且包括特征重要性评估步骤214和最终特征子集选择步骤216。特征重要性评估步骤214包括评估所有 10×10 倍交叉验证试验和倍数(folds)的平均特征重要性。并且最终特征子集选择步骤216包括基于在步骤214获得的平均特征重要性值的最终特征子集选择。

[0059] 结果是最终选择的特征子集 F_{final} 218。为了验证,使用 10×10 倍交叉验证220进行 F_{final} 的最终训练和测试准确度的评估。

[0060] 参考图3,包括图3A至3F,图像300、图像310、图像320、图像330、图像340、图像350描绘了根据本实施方案在RELA(红色)和核DNA(蓝色)荧光染色后用不同化合物获得的示例性免疫荧光图像数据。参考图3A,图像300描绘了从细胞培养物获得的荧光染色的HepaRG细胞,其中细胞已经用 $100\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素处理(阳性对照)。参考图3B和图3C(图像310、图像

320) 分别用1000 μ g/mL阿卡波糖、1000 μ g/mL四环素处理细胞。两种化合物在体内对肝细胞都是有毒的。

[0061] 参考图3D, 图像330描绘了载体对照的荧光染色细胞。并参考图3E和图3F (图像340和图像350) 细胞分别用100 μ g/mL乙二醇和1000 μ g/mL氯化锂处理。

[0062] 图像300、图像310、图像320、图像330、图像340、图像350描绘了通过使用高含量分析器(成像装置120)的高通量筛选而成像的HepaRG细胞。与载体对照图像330相比, 图像300、图像310、图像320中的肝毒性诱导的表型变化和RELA (NF- κ B p65) 302的分布改变。当用非肝毒性化合物处理细胞时未观察到这种表型变化, 如图像340、图像350所示。肝毒性阿卡波糖(图像310)对人肾近端小管细胞无毒。因此, 在以前的肾脏模型研究中, 没有观察到由肝毒性阿卡波糖诱导的人原发性肾近端小管细胞(HPTC)或HPTC样细胞的变化; 然而, 肝毒性阿卡波糖诱导HepaRG细胞的明显变化, 如图像310所示。乙二醇(肾毒性和神经毒性)和氯化锂(肾毒性)在人体中对于除肝脏之外的其他器官都是有毒的。然而, 如图像340、图像350所示, 这些化合物在HepaRG细胞中没有诱导明显的表型变化。这些和其他结果表明细胞的反应是高度器官特异性的。在传统的肝毒性测试中, 几乎所有具有其他毒性的非肝毒性化合物在基于HepG2的模型中都给出了阳性结果。因此, 与根据本实施方案的基于HepaRG的模型相反, 常规的基于HepG2的模型不是肝特异性的, 而是一般性地检测细胞毒性。

[0063] 参考图4, 描绘了用于验证根据本实施方案的用于准确预测化合物诱导的损伤的高通量方法的参考化合物信息表。基于使用PubMedTM和Google[®]的文献调查, 已经鉴定为对人类肝细胞有毒的那些化合物用“+”表示。

[0064] 参考图5, 该表示出了由4个特征组成的最终所选特征子集 F_{final} (218)。相对于评估的最终训练和测试精度(220)指示 Δ_{max} (208)。使用荧光标记的HepaRG细胞和用于预验证的98个化合物组获得结果(图4)。

[0065] 图6描绘了用于预验证根据本实施方案的用于准确预测化合物诱导的对诱导多能干细胞(iPS)来源的肝细胞样细胞的损伤的高通量方法的参考化合物信息表。

[0066] 图7显示了说明由体内损伤肝细胞的化合物诱导的iPS来源的肝细胞样细胞的表型变化的图像数据。具体地, 在图7中, 用在指定浓度的已知具有毒性的化合物(顶行中列出的化合物-硫唑嘌呤、氯化镉、盐酸雷尼替丁、嘌呤霉素)或在体内对肝细胞无毒性的化合物(底行中列出的化合物-阿斯巴甜、咖啡因、尼古丁、DMSO)(基于化合物诱导的人体临床效应的文献分类)和各自阳性对照(125 μ M嘌呤霉素)和载体对照(0.5%二甲基-亚砷, DMSO)处理iPS来源的肝细胞样细胞(iCell肝细胞)。在RELA(红色)和核DNA(蓝色)免疫荧光染色后, 通过高含量筛选对细胞成像。这些图像数据展示了由体内损伤肝细胞的化合物诱导的表型细胞变化(顶行的图像)。

[0067] iCell肝细胞(iCells)购自Cellular Dynamics (Madison, Winconsin, USA)。用含有1 $\times$ B27、20ng/mL制瘤素M、0.1 μ M地塞米松、25 μ g/mL庆大霉素和1 $\times$ iCell肝细胞培养基补充物的RPMI培养基解冻iCell。

[0068] 然后将iCell接种到胶原蛋白I包被的384孔板中, 接种密度为每孔30,000个细胞。在化合物处理之前将细胞培养7天。用测试化合物以7个浓度(范围为2 μ M至1mM)的剂量范围处理iCells 16小时。

[0069] 用于预验证的文库包含对人类肝细胞具有充分记录的临床效果的24种化合物(图

4中列出的98种化合物的子集)。该文库包含各种类型的化学品,包括药物、工业化学品、农用化学品、环境毒物和食品添加剂。

[0070] 化合物处理后,通过免疫染色检测生物标志物,并用WCS染色全细胞。使用ImageXpress Micro XLS系统(Molecular Devices,Sunnyvale,CA,USA),用20×物镜进行高含量筛选。

实施例

[0071] 为了证明本实施方案,HepG2细胞(用作对照)和HepaRG细胞分别购自美国典型培养物保藏中心(ATCC,Manassas,Virginia,USA)和ThermoFisher Scientific(新加坡)。HepG2细胞在T75Corning Costar烧瓶中培养,其中Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)补充有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素。将HepG2细胞接种到具有透明底部(#781091;Greiner,Kremsmuenster,Austria)的384孔黑色板中,密度为10,000个细胞/cm²。将HepG2细胞培养3天以达到融合,然后进行16小时的化合物处理。将HepaRG细胞以250,000个细胞/cm²的密度直接接种到具有包被有100μg/mL胶原蛋白I的透明底部(#781091;Greiner)的384孔黑色板中。在最初的二十四小时培养中,使用补充有HepaRG Thaw,Plate&General Purpose培养基的Williams E培养基。随后,在补充有HepaRG Tox培养基和1% GlutaMAX(所有培养基和补充物来自ThermoFisher Scientific)的Williams E培养基中培养HepaRG细胞7天,培养基补充在培养的第1天和第4天。HepaRG细胞培养7天,然后过夜化合物处理16小时。用于毒性研究的HepaRG培养方案获自ThermoFisher Scientific。

[0072] 化合物处理

[0073] 用如图4的表中所列的98种化合物处理细胞16小时。通过使用以下七种浓度的剂量范围对每种化合物进行筛选:2μM、15μM、63μM、125μM、250μM、500μM和1mM。嘌呤霉素(125μM)和氯丙嗪(15μM)用作阳性对照,而地塞米松(250μM和1mM)用作阴性对照。每个平板中包括未处理的细胞(无药物,无载体)和各自的载体对照(二甲基亚砜(DMSO)或水)。每种处理条件包括四个技术重复(每个数据点四个孔)。计算每个板的Z'值,并且值均高于0.5,范围为0.62至0.89。

[0074] 免疫染色

[0075] 在化合物暴露16小时后,细胞用含磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的3.7%甲醛固定6小时。然后封闭细胞并用含有5%牛血清白蛋白(BSA)和0.2%Triton X-100的PBS在室温透化1小时。随后,样品在室温与1μg/mL的兔多克隆抗RELA抗体(#ab16502;Abcam,Cambridge,UK)或2μg/mL小鼠单克隆抗-γ H2AX(磷光体S139)抗体(#ab26350;Abcam)一起温育1小时。然后样品与5μg/mL缀合Alexa-488的山羊抗兔二抗(#A11008;Life Technologies,Singapore)或与缀合Alexa-647(#A21235,Life Technologies)的山羊抗小鼠二抗一起温育。在每个平板上用罗丹明鬼笔环肽(#R415;1:100;Invitrogen,Singapore)检测到F-肌动蛋白。在每个平板上用4ng/mL的4',6-二脒基-2苯基吲哚二盐酸盐(DAPI;#268298;Merck,Darmstadt,Germany)染色细胞核和全细胞,并将全细胞染成红色(WCS;#8403402;1:100;Cellomics,Rockford,United States of America)。

[0076] 图像采集

[0077] 使用ImageXpressMICRO系统(Molecular Devices,Sunnyvale,CA,USA)用20×物

镜进行自动成像。以4个通道每孔9个位点成像,图像以16位TIFF格式保存。

[0078] 图像分割和特征提取

[0079] 为了减少不均匀的背景照明,使用ImageJ (NIH,v1.48)中实现的“滚球”算法校正图像。使用cellXpress™专有软件平台进行细胞分割和特征测量。

[0080] Haralick的纹理特征

[0081] 灰度共生矩阵 (GLCM) 是描述在 $N_x \times N_y$ 图像中在给定偏移 $(\Delta x, \Delta y)$ 处的共同出现的灰度值的分布的矩阵, $I(x, y)$, 具有 N_g 灰度级。在这些表示法中, x 和 y 分别是行索引和列索引。GLCM矩阵由等式1定义。

$$[0082] \quad GLCM_{\Delta x, \Delta y}(i, j) = \sum_{x=1}^{N_x} \sum_{y=1}^{N_y} \begin{cases} 1, & \text{if } I(x, y) \text{ and } I(x + \Delta x, y + \Delta y) = i \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

[0083] 其中 i 和 j 是图像的灰度值或强度值。归一化的GLCM矩阵是

$$[0084] \quad p(i, j, \Delta x, \Delta y) = \frac{GLCM_{\Delta x, \Delta y}(i, j)}{\sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} GLCM_{\Delta x, \Delta y}(i, j)} \quad (2)$$

[0085] 求和概率矩阵计算为

$$[0086] \quad p_{x+y}(k, \Delta x, \Delta y) = \sum_{x=1}^{N_g} \sum_{y=1}^{N_g} p(i, j, \Delta x, \Delta y) \quad (3)$$

[0087] 其中 $k=2, 3, \dots, 2N_g$ 。GLCM的总和平均值在等式(4)中示出。

$$[0088] \quad f_{SA}(\Delta x, \Delta y) = \sum_{k=2}^{2N_g} k p_{x+y}(k, \Delta x, \Delta y) \quad (4)$$

[0089] 在验证研究中,图像是分割细胞周围的边界框,所有背景像素都设置为零。然后将图像量化为 $N_g=256$ 灰度级,并且计算针对0度 $(\Delta x=0, \Delta y=1)$ 、45度 $(\Delta x=1, \Delta y=1)$ 、90度 $(\Delta x=1, \Delta y=0)$ 和135度 $(\Delta x=1, \Delta y=-1)$ 偏移的所有Haralick的特征。对于每个特征,使用所有偏移值的平均值,并使用cellXpress™软件平台提取所有纹理特征。

[0090] 浓度响应曲线和 $\Delta_{\max}$ 评估

[0091] 在特征提取之后,通过在相应的载体对照条件下的特征值来划分在所有测试化合物浓度的特征值。然后,将比率进行 $\log_2$ 变换 (Δ) 。所有进一步的数据分析,包括建立浓度响应曲线和毒性分类,都是在R统计环境(R基础,v3.0.2)和Windows 7操作系统(Microsoft,USA)下使用定制脚本进行的。

[0092] 对于每个特征,使用标准对数-逻辑模型评估浓度响应曲线,如等式(5)所示。

$$[0093] \quad \Delta(x, (b, c, d, e)) = \frac{d-c}{1+\exp\{b(\log(x)-\log(e))\}} \quad (5)$$

[0094] 其中 x 是异种生物学物质化合物浓度, e 是下限 c 和上限 d 之间的响应, b 是 e 附近的相对斜率。R环境下的“drc”库(v 2.3-96)用于拟合 b, c, d 和 e 的值。之后,使用评估的响应曲线确定最大响应值 $(\Delta_{\max})$ 。理论上, $\Delta_{\max}$ 应等于上限 d 。然而,在实践中,即使在最高测试剂量下,一些化合物的反应也可能不稳定。因此,评估的 d 值可能不准确。相反 $\Delta_{\max}$ 固定为1mM、2mM或5mM的响应值,这是大多数化合物的大约最高测试浓度。最后,计算所有重复中 $\Delta_{\max}$ 的中值。

[0095] 特征归一化

[0096] 在数据分类之前,将每个特征向量 f_i 归一化至相同范围 $[-1, 1]$,如等式(6)所示。

$$[0097] \quad f_i \leftarrow 2 \frac{(f_i - f_{\min})}{f_{\max} - f_{\min}} - 1 \quad (6)$$

[0098] 其中 $f_{\min}$ 和 $f_{\max}$ 是特征的最小值和最大值。为了确保训练数据集和测试数据集彼此独立,这两个归一化系数仅使用训练数据进行估算,但同时应用于训练数据集和测试数据集。

[0099] 随机森林分类

[0100] 随机森林算法用于预测异种生物学物质诱导的肾毒性,因为此算法以前已被证明优于其他常用分类器,包括支持向量机、k-邻域法和朴素贝叶斯。另外,使用R环境下的“randomForest”库(v4.6-10)。

[0101] 分类性能评估

[0102] 使用分层10倍交叉验证程序来评估表型特征的毒性预测性能。使用的性能测量结果显示在等式(7)、(8)和(9)中。

$$[0103] \quad \text{敏感性} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100\% \quad (7)$$

$$[0104] \quad \text{特异性} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100\% \quad (8)$$

$$[0105] \quad \text{平衡准确性} (acc) = \frac{\text{敏感性} + \text{特异性}}{2} \quad (9)$$

[0106] 其中TP是真阳性的数量,TN是真阴性的数量,FP是假阳性的数量,FN是假阴性的数量。图5描绘了总结根据本实施方案的所有三个数据集的单特征分类器和多特征分类器的总体预测性能的表格。

[0107] 参考图5,表格列出了根据本实施方案的针对图4中列出的98种化合物被测试时的HepaRG细胞的表型特征集及其预测性能。表型特征集包括:染色体区域处DNA标记强度的变异系数、核区域处DNA灰度共生矩阵(GLCM)的求和均值的平均值、染色体区域处RELA标记强度的平均值,以及核区域处RELA对象的总强度的一部分。 $\text{RELA对象的核分数} = \frac{I(C \cap D)}{I(D)}$,其中RELA对象是具有高水平RELA染色的亚细胞区域,I(D)是RELA-对象区域处的所有像素的强度值的总和,并且I(C ∩ D)是细胞质和RELA-对象区域交叉处的所有像素的强度值的总和。使用1mM的浓度来评估这些特征组合的最大响应值($\Delta_{\max}$)导致测试灵敏度为47.9%-61.4%、测试特异性为86.1%-92.1%、测试准确度为70.0%-73.8%。

[0108] 因此,可以看出,本实施方案提供了改进的用于预测药物诱导的人肝损伤的模型,其利用基于准确和高通量筛选(HTS)的方法和系统预测化合物诱导的体内肝细胞损伤。根据本实施方案预测体内肝细胞毒性是基于HepaRG细胞而不是HepG2细胞,并且已经实现了高灵敏度和准确性(对于测试的98种化合物,测试灵敏度为61.4%,测试特异性为86.1%,并且测试平衡准确率为73.8%)。

[0109] 与确定化合物对培养的肝细胞的毒性的常规模型不同,根据本实施方案的系统和方法仅观察体外培养细胞中诱导的变化并使用这些变化来预测体内肝细胞毒性。根据本实施方案的HTS模型进行二元预测,并对体内肝细胞毒性给出是/否答案。然而,不能对剂量进行预测。这可以通过用计算模型或预测人体剂量反应的其他体外模型补充HTS模型来克服。这些模型仍处于试验阶段,但未来这可能是一种选择。本实施方案的优点是其高通量。它可以在化合物筛选的非常早期阶段有效应用,并且可以允许标记被预测为在体内对肝细胞有

毒的所有化合物。对于大多数这些化合物,可能不需要更详细的剂量反应信息。

[0110] 此外,本公开包括根据以下条款的实施方案:

[0111] 条款1.一种用于预测由测试化合物诱导的人肝损伤的方法,包括:获取从细胞培养物获得的荧光染色细胞的图像,其中细胞已经用剂量范围的至少测试化合物及其载体处理;分割获取的图像;从分割图像中提取和分析一个或多个表型特征,其中一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征,由分割图像中的(a) DNA特征、(b) RELA (NF- κ B p65)特征、和(c)肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征组成;将处理的样品的结果归一化至载体对照;以及使用监督分类器基于测试化合物诱导的归一化的所提取的表型特征变化来预测测试化合物对人肝损伤的概率。

[0112] 条款2.根据条款1的方法,其中从分割图像中提取一个或多个表型特征包括提取表型特征,测量分割图像中染色体区域处DNA强度的变异系数。

[0113] 条款3.根据条款1的方法,其中从分割图像中提取一个或多个表型特征包括提取两个表型特征,所述表型特征由(a)分割图像中染色体区域处的总DNA对象强度的一部分和(b)从灰度共生矩阵(GLCM)确定的分割图像中的核区域处的RELA标记的方差之和的平均值组成。

[0114] 条款4.根据条款1的方法,其中从分割图像中提取一个或多个表型特征包括提取四个表型特征,所述表型特征由(a)分割图像中染色体区域处的总DNA对象强度的一部分、(b)从灰度共生矩阵(GLCM)确定分割图像中的核区域处的RELA的方差之和的平均值、(c)分割图像中的一个或多个核区域的周长以及(d)分割图像中染色体区域和核区域之间的总RELA强度的比率组成。

[0115] 条款5.根据条款1的方法,其中所述细胞选自包括分化的肝细胞、诱导的多能干细胞(iPS)来源的人肝细胞样细胞、原代人肝细胞和(永生化的)人肝细胞细胞系的组。

[0116] 条款6.根据条款5的方法,其中分化的肝细胞来源自人肝前体细胞样细胞系。

[0117] 条款7.根据条款6的方法,其中来源自人肝前体细胞样细胞系的分化的肝细胞是HepaRGTM细胞。

[0118] 条款8.根据条款1至7中任一项所述的方法,其中细胞培养物的细胞在2D培养中培养。

[0119] 条款9.根据条款1至8中任一项所述的方法,还包括荧光标记细胞培养物中培养的细胞以检测DNA、RELA (NF- κ B p65)、F-肌动蛋白, γ H2AX和全细胞中的一种或多种的步骤。

[0120] 条款10.根据条款1至9中任一项的方法,其中处理细胞包括用至少一种测试化合物和载体处理人肝细胞至少12小时或过夜的预定持续时间。

[0121] 条款11.根据条款10的方法,其中处理细胞包括用至少一种测试化合物和载体处理人肝细胞的16小时或更长的预定持续时间。

[0122] 条款12.根据条款1至11中任一项的方法,其中预测人肝毒性包括:用剂量范围的至少一种测试化合物和载体处理细胞;确定关于表型特征的最大响应值($\Delta_{\max}$);并使用监督分类器基于化合物诱导的特征变化预测人肝毒性。

[0123] 条款13.根据条款12的方法,其中使用监督分类器来预测人肝毒性包括使用监督分类器用于化合物分类,该监督分类器使用细胞的归一化表型特征变化的最大响应值($\Delta_{\max}$)的中值。

[0124] 条款14.根据条款12的方法,最大响应值包括在测试化合物的浓度为1mM、2mM或5mM时的响应值。

[0125] 条款15.根据条款1的方法,其中预测人肝毒性包括:当测试多于一种测试化合物时,将不同测试化合物的表型特征归一化至相同范围;并且通过使用已经用统计学上独立于测试组化合物的训练组化合物训练的机器学习分类算法预测人肝毒性。

[0126] 条款16.根据条款15的方法,其中机器学习分类算法是随机森林算法。

[0127] 条款17.根据条款15的方法,其中机器学习分类算法是支持向量机。

[0128] 条款18.一种用于预测由至少一种测试化合物诱导的人肝损伤的系统,包括:用于用至少一种测试化合物及其载体处理细胞培养物并染色细胞培养物以用于荧光检测的设备;相对于该设备布置以获取用于检测细胞及其染色成分荧光染色细胞的图像的的成像装置;以及连接到所述成像装置用于接收和分割所获取的图像的计算装置,所述计算装置包括用于从所述分割图像中提取和分析一个或多个表型特征的特征提取模块,其中所述一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组,由分割图像中的(a) DNA特征、(b) RELA (NF- κ B p65) 特征、和(c) 肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征,该计算装置还包括预测模块,用于将处理的样品的结果归一化至载体对照,并使用监督分类器基于测试化合物诱导的归一化的所提取的表型特征变化来预测测试化合物对人肝损伤的概率。

[0129] 条款19.根据条款18的系统,其中特征提取模块从分割图像中提取表型特征,测量分割图像中染色体区域处DNA强度的变异系数。

[0130] 条款20.根据条款19的系统,其中特征提取模块提取两个表型特征,所述表型特征由(a) 分割图像中的染色体区域处的总DNA对象强度的一部分和(b) 从灰度共生矩阵 (GLCM) 确定的分割图像中的核区域处的RelA标记的方差之和的平均值组成。

[0131] 条款21.根据条款19的系统,其中特征提取模块提取四种表型特征,所述表型特征由以下组成:(a) 分割图像中染色体区域处的总DNA对象强度的一部分、(b) 从灰度共生矩阵 (GLCM) 确定的分割图像中核区域处的RelA标记的方差之和的平均值、(c) 分割图像中一个或多个核区域的周长,和(d) 分割图像中染色体区域和核区域之间的总RelA标记强度的比率。

[0132] 条款22.根据条款19至21中任一项的系统,其中计算装置的预测模块通过使用监督分类器基于相对于用至少一种测试化合物和载体处理的细胞的表型特征变化的最大响应值($\Delta_{\max}$)来预测人肝毒性。

[0133] 条款23.根据条款22的系统,其中计算装置的预测模块通过使用监督分类器来预测人肝毒性,该监督分类器使用归一化的表型特征变化的最大响应值($\Delta_{\max}$)的中值。

[0134] 条款24.根据条款22的系统,其中最大响应值包括在测试化合物的化合物浓度为1mM、2mM或5mM时的响应值。

[0135] 条款25.根据条款20至24中任一项的系统,其中计算装置的预测模块基于当使用多于一种测试化合物时归一化至相同范围的表型特征变化并且通过使用统计学上独立的训练组化合物训练的机器学习分类算法来预测人肝毒性。

[0136] 条款26.根据条款25的系统,其中机器学习分类算法是随机森林算法。

[0137] 虽然已经在本发明的前述详细描述中呈现了示例性实施方案,但是应当理解,存在大量变型。还应当理解,示例性实施方案仅是示例性的,并不旨在以任何方式限制本发明

的范围、适用性、操作或配置。相反,前面的详细描述将为本领域技术人员提供用于实现本发明的示例性实施方案的便利路线图,应当理解,在不脱离所附权利要求中阐述的本发明的范围的情况下,可以对示例性实施方案中所述的步骤和操作方法的功能和布置进行各种修改。

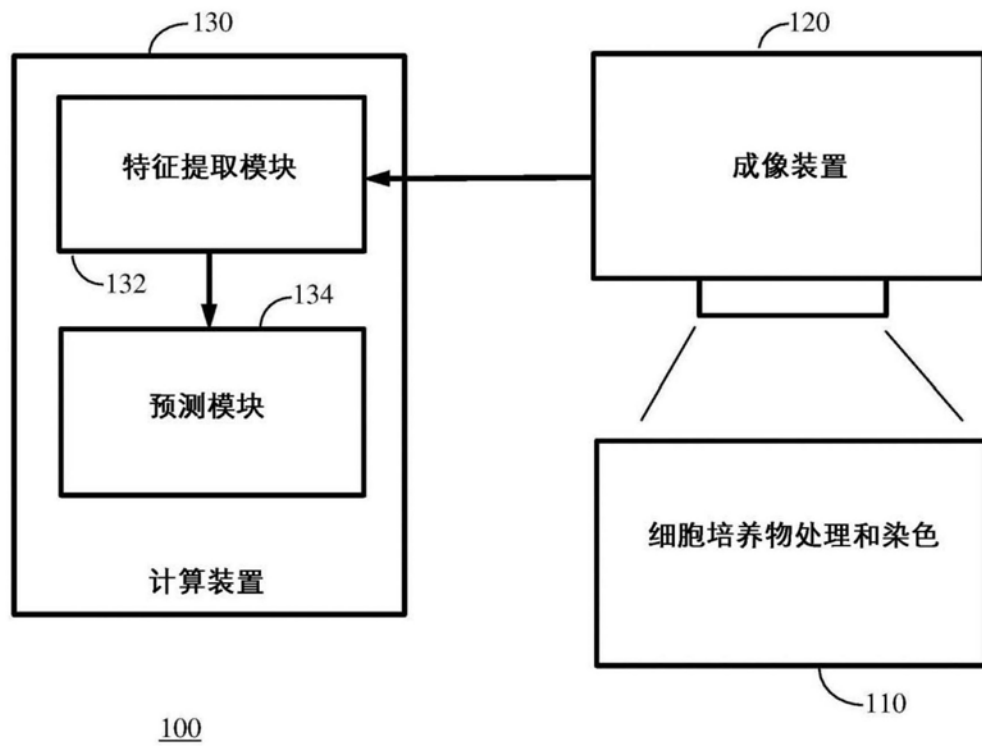


图1

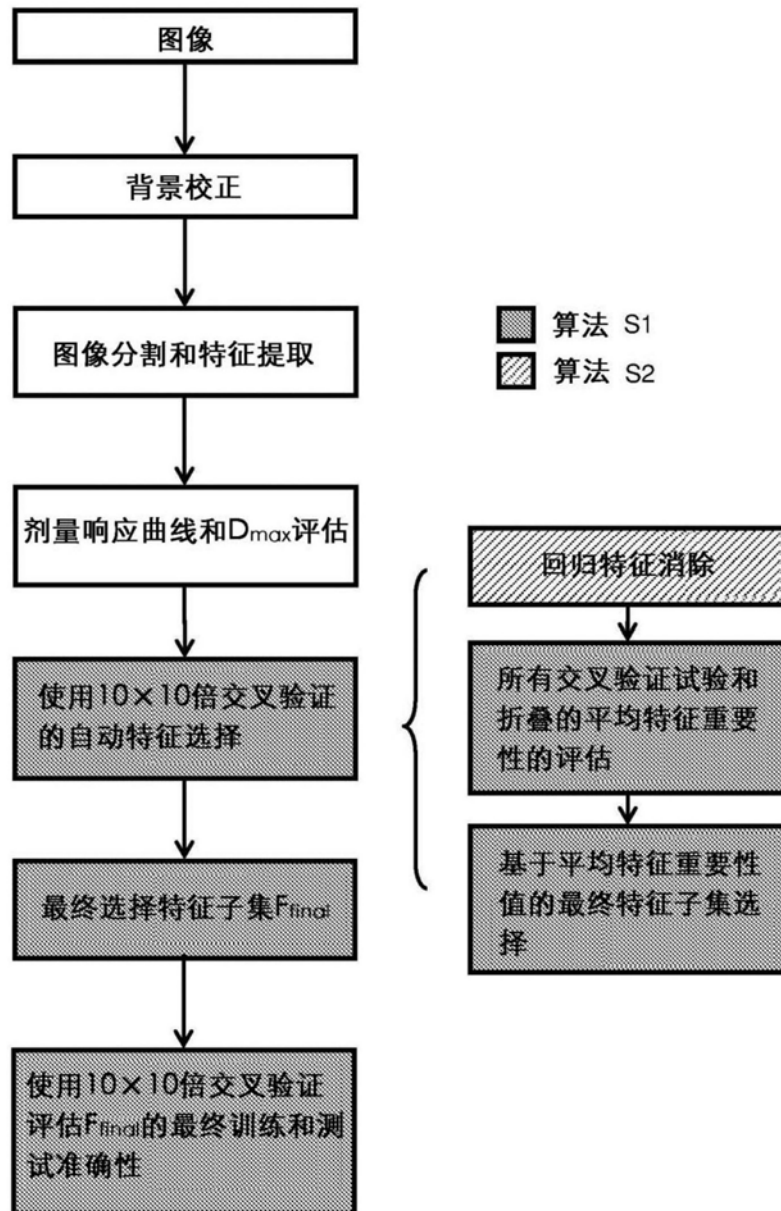
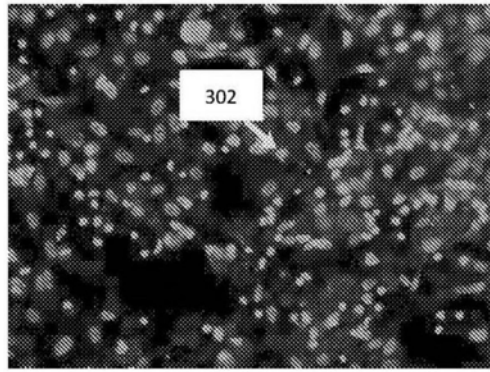
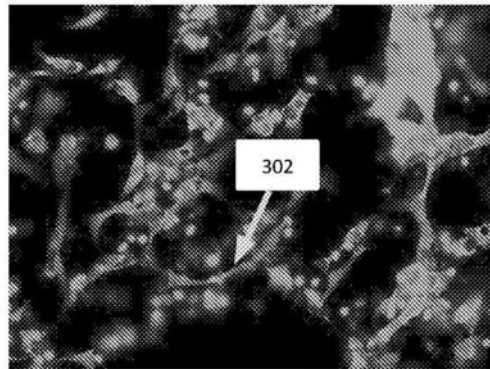


图2



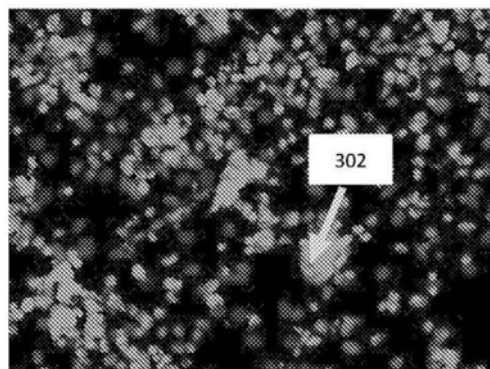
300

图3A



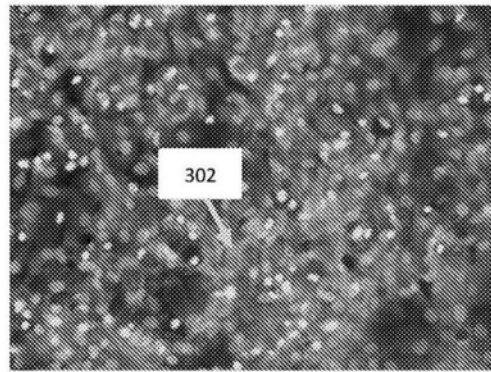
310

图3B



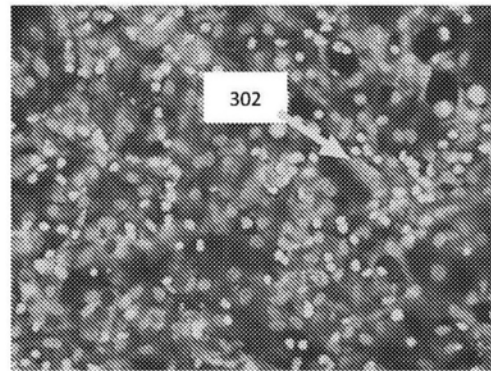
320

图3C



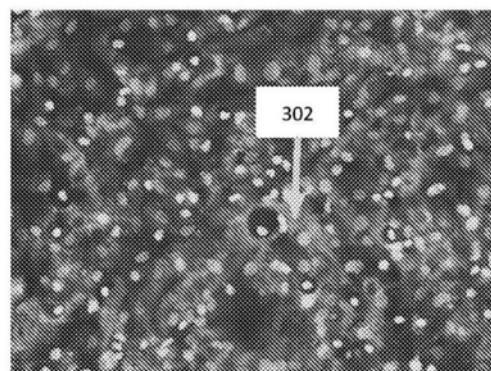
330

图3D



340

图3E



350

图3F

S/N	化学品	体内干细胞 毒性
1	阿卡波糖	+
2	乙酰氨基磺酸钾	-
3	乙酰氨基苯酚	-
4	对乙酰氨基酚	-
5	尿囊素	-
6	马兜铃酸	+
7	砷(Ⅲ)氧化物	+
8	青蒿素	-
9	抗坏血酸	-
10	阿斯巴甜	-
11	硫唑嘌呤	+
12	阿奇霉素	+
13	甜菜碱	-
14	比卡鲁胺	+
15	铋(Ⅲ)氧化物	+
16	氯化镉(Ⅱ)	+
17	咖啡因	-
18	卡培他滨	-
19	先锋霉素(Ⅱ)	-
20	水合氯醛	-
21	辛可芬	+
22	环丙沙星	+
23	顺铂	-
24	橘霉素	-
25	安妥明	-
26	考来替泊	-
27	氯化铜(Ⅱ)	+
28	环孢菌素 A	+
29	醋酸环丙孕酮	+
30	D-α-生育酚	-
31	达卡巴嗪	+
32	双氯芬酸	+
33	盐酸地尔硫卓	+
34	DOPA	-
35	度他雄胺	-
36	恩曲他滨	-
37	表没食子儿茶素没食子酸酯	+
38	依普利酮	-
39	乙二醇	-
40	非尔氨脂	+
41	非那雄胺	-
42	5-氟尿嘧啶	+

图4

43	氟他胺	+
44	速尿	+
45	藤黄酸	-
46	庆大霉素硫酸盐	-
47	谷胱甘肽	-
48	甘氨酸	-
49	氯化金 (1)	+
50	氟烷	+
51	布洛芬	+
52	异环磷酰胺	-
53	异烟肼	+
54	酮康唑	+
55	酮咯酸	-
56	来氟米特	+
57	林可霉素	-
58	氯化锂	-
59	褪黑激素	-
60	薄荷醇	-
61	二甲双胍Hel	-
62	甲氨蝶呤	+
63	甲基香草酸酯	-
64	莫达非尼	-
65	N-乙酰基 - 半胱氨酸	-
66	纳洛酮	-
67	盐酸纳曲酮	-
68	萘普生	+
69	奈韦拉平	+
70	尼古丁	-
71	青霉素	-
72	非那西丁	-
73	重铬酸钾	+
74	丙磺舒	-
75	异丙嗪	-
76	盐酸雷尼替丁	+
77	维甲酸	-
78	利巴韦林	-
79	利福平	+
80	辛伐他汀	-
81	氯化钠	-
82	丙戊酸钠	+
83	司他夫定 (d4T)	+
84	蔗糖	-
85	舒尼替尼苹果酸盐	+
86	他克莫司	-
87	四环素	+
88	茶碱	-

图4 (续)

89	替加环素	-
90	托卡朋	+
91	托伐普坦	+
92	托拉塞米	-
93	雷公藤甲素	+
94	柠檬酸三钠二水合物	-
95	曲格列酮	+
96	伐昔洛韦	-
97	万古霉素	+
98	伐地那非盐酸盐	-

图4(续)

No.	特征组	$\Delta_{\max}$ 浓度	测试 敏感性	测试 特异性	测试 准确性
1	染色体区域处的DNA 强度的变异系数	1mM	61.4%	86.1%	73.8%
2	核区域处DNA GLCM 的求和均值的平均值	1mM	56.0%	89.5%	72.7%
3	染色体区域处的RELA 的平均强度	1mM	53.1%	89.6%	71.4%
4	核区域处的RELA对象 的总强度的部分	1mM	47.9%	92.1%	70.0%

图5

S/N	化学品	体内肝细胞 毒性
1	乙酰磺胺酸钾	-
2	砷(III)氧化物	+
3	阿斯巴甜	-
4	硫唑嘌呤	+
5	氯化镉(II)	+
6	咖啡因	-
7	水合氯醛	-
8	橘霉素	-
9	安妥明	-
10	环孢菌素 A	+
11	双氯芬酸	+
12	非尔氨脂	+
13	5-氟尿嘧啶	+
14	藤黄酸	-
15	谷胱甘肽	-
16	甘氨酸	-
17	金(I)氯化物	+
18	异烟肼	+
19	莫达非尼	-
20	尼古丁	-
21	盐酸雷尼替丁	+
22	四环素	+
23	托拉塞米	-
24	万古霉素	+

图6

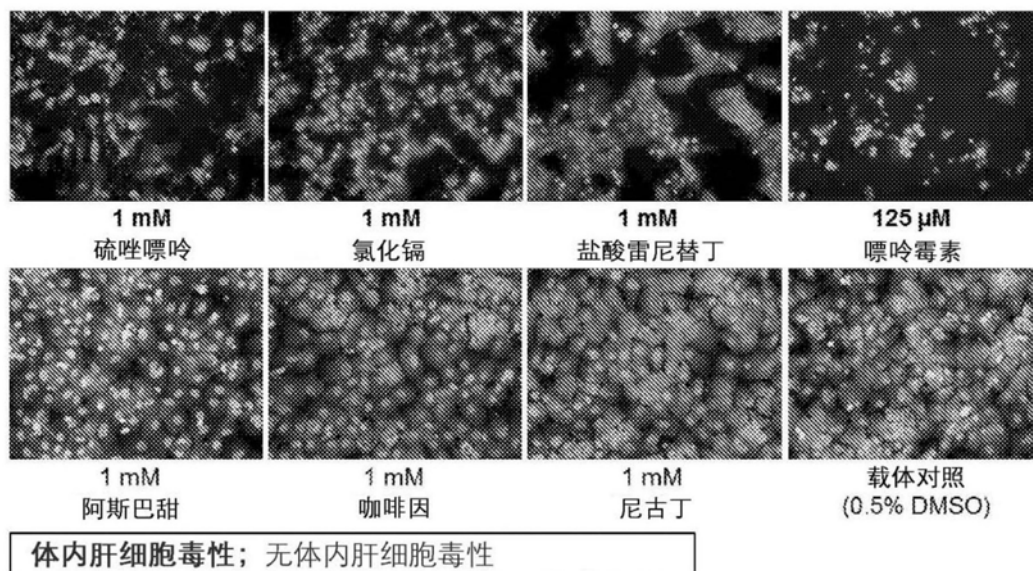


图7

专利名称(译)	用于准确预测化合物诱导的肝损伤的高通量法		
公开(公告)号	CN109072304A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201780022654.6	申请日	2017-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
[标]发明人	D 金克 N F B 阿克巴 侯赛因 L H 洛 A W 林		
发明人	D·金克 N·F·B·阿克巴·侯赛因 L·H·洛 A·W·林		
IPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/533 G01N33/68 G06T7/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/142 C12Q2600/158 G01N33/5008 G06T7/0012 G06T2207/10064 G06T2207/20081 G06T2207/30024 G06T2207/30056 G16B20/00 G16B40/00 G16H30/40 G16H50/20 G01N33/533 G01N33/68		
代理人(译)	康健 王思琪		
优先权	10201602855P 2016-04-11 SG		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了一种用于预测由测试化合物对肝细胞的损伤而导致的体内肝损伤的方法和系统。该方法包括获取从细胞培养物获得的荧光染色细胞的图像，其中该细胞已经用剂量范围的至少所述测试化合物及其载体处理。所述细胞可以是肝细胞，包括原代或永生化肝细胞、肝癌细胞或诱导多能干细胞来源的肝细胞样细胞。获取的图像被分割。该方法还包括从分割图像中提取和分析一个或多个表型特征，其中所述一个或多个表型特征选自强度、结构、形态或比率计特征的组，由在分割图像中的(a)DNA特征、(b)RELA(NF- κ B p65)的特征、和(c)肌动蛋白丝在不同亚细胞区域的特征和(d)细胞器及其子结构的特征组成。最后，该方法包括将处理的样品的结果归一化至载体对照，并使用机器学习方法基于测试化合物诱导的归一化的所提取和选择的表型特征变化来预测测试化合物对肝损伤的概率。

