

机器学习在抗体制剂不溶性微粒分类识别中的应用

郭莎^{1#}, 郭翔^{2#}, 高洁¹, 许东泽², 梅玉婷¹, 王翠², 夏喜杰^{1,3}, 李灵坤², 贺鹏飞¹, 吴宏宇², 吴昊^{2*}, 王兰^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110179; 3. 中国药科大学, 南京 210009)

摘要 **目的:** 对微流成像技术收集的抗体注射剂的不溶性微粒图片进行分类建模, 以建立不溶性微粒的分类和溯源分析方法。**方法:** 本研究首先制备并用微流成像系统获得气泡、硅油液滴、玻璃颗粒、反复冻融产生的蛋白颗粒4种不同类型颗粒的图片, 并将这些图片分为训练集和测试集两部分。采用3种卷积神经网络 (Convolutional Neural Network, CNN) 模型, 即ResNet50、DenseNet201和ShuffleNetV2, 对训练集中的图片进行训练和识别, 建立数据集, 并用于对测试集图片的识别。此外, 通过在实际样品中的应用, 将CNN模型识别和人眼分类的准确性和速度进行对比。**结果与结论:** 各模型对于测试集的识别准确率都达到96%以上, 且DenseNet201模型具有更优的稳定性; 与人眼识别相比, 准确率没有显著差异, 识别速度更快且具有显著差异。本研究表明CNN模型能够对蛋白质制剂中不溶性微粒图片进行分类和溯源分析, 以便采取有针对性的措施, 降低药品的潜在风险和安全隐患。

关键词: 机器学习; 蛋白质制剂; 卷积神经网络; 不溶性微粒

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)01-0071-11

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.01.010

Application of Machine Learning in Classification and Recognition of Insoluble Particles in Antibody Formulations

Guo Sha^{1#}, Guo Xiang^{2#}, Gao Jie¹, Xu Dongze², Mei Yuting¹, Wang Cui², Xia Xijie^{1,3}, Li Lingkun², He Pengfei¹, Wu Hongyu², Wu Hao^{2*}, Wang Lan^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110179, China; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Objective: To classify and modeling of insoluble particles in antibody injections collected by microfluidic imaging technology, in order to establish a classification and traceability analysis method for insoluble particles. **Methods:** In this study, four different types of images including bubble, silicone oil droplets, glass particles and protein particles generated by repeated freezing and thawing were obtained by the microflow imaging system. These images were divided into training set and test set. The characteristics of images in training

基金项目: 国家药典标准提高课题 (编号 2020S11); 中国食品药品检定研究院关键技术研究基金 (编号 GJJS-2022-1-4); 辽宁省博士启动基金项目 (编号 2021-BS-131)

作者简介: 郭莎 Tel: (010) 53852123; E-mail: guosha@nifdc.org.cn

共同第一作者: 郭翔 Tel: 13755455652; E-mail: 991693754@qq.com

通信作者: 王兰 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

吴昊 Tel: 13904221830; E-mail: haowu@syphu.edu.cn

set were studied by and trained in three Convolutional Neural Network(CNN) models, namely ResNet50, DenseNet201 and ShuffleNetV2, in order to establish data model. The recognition and classification performance of the model were tested by the images in the test set. Besides, the classification accuracy and speed of the three CNN models were compared with that of human eyes through application in an actual case. **Results and Conclusion:** The recognition accuracy of each model for the test set is above 96%, and the DenseNet201 model has better stability. Compared with human eye recognition, there is no significant difference in accuracy, but a significant acceleration in recognition speed. This study proves that CNN model can be applied in classification and traceability analysis of insoluble particles in protein preparations, so that targeted measures can be taken to reduce the potential risks and safety hazards of drugs.

Keywords: machine learning; protein formulation; Convolutional Neural Network; insoluble particle

1 引言

治疗性抗体制剂中不溶性微粒的检测和表征越来越受到业界的关注^[1], 有研究报道抗体制剂中不溶性微粒会引起人体严重的注射副作用和非正常免疫应答^[2], 威胁患者生命安全^[3]。但由于生产工艺的限制和蛋白质本身的不稳定性, 蛋白质制剂中的不溶性微粒常常是难以避免的^[4-5]。根据美国药典(USP<1787>)^[6]中的论述, 蛋白质制剂中的颗粒一般被分为“外源颗粒”“内源颗粒”和“固有颗粒”。外源颗粒包括毛发、与加工无关的纤维、矿物质、昆虫部分, 以及类似的无机和有机材料; 内源颗粒来自加工设备、包装材料, 包括不锈钢、密封件、垫圈、包装玻璃、流体输送管和硅油润滑剂等; 固有颗粒则与蛋白分子本身和其处方相关, 如抗体分子自发聚集形成的不溶性微粒。蛋白质聚集主要是由于生产及运输中的外界应力引起产品稳定性的变化, 包括冻融、振荡、剪切、高温等或者这些应力的组合^[7]。由于颗粒物来源复杂及其潜在的安全隐患, 因此微粒类型识别是其表征中至关重要的一个方面, 有助于对制剂中的颗粒物进行溯源, 从而实施规避策略, 减少不溶性微粒的产生, 降低潜在风险。

不溶性微粒的药典检测方法是光阻法(Light Obscuration, LO), 《中华人民共和国药典》2020年版四部通则0903中LO限度规定: $\geq 10 \mu\text{m}$ 的微粒应小于等于6000粒/支, $\geq 25 \mu\text{m}$ 的微粒应小于等于600粒/支。该技术虽可确定微粒的大小和数量, 但是不能区分抗体制剂中可能存在的不同微粒类型, 如蛋白质颗粒、硅油等, 并且透明的蛋白质颗粒难以被光阻法检测到^[8], 影响检测结果的准确性。动态光散射(Dynamic Light Scattering, DLS)

和非对称流场分离(Flow Field Flow Fractionation, FFF)技术可检测微粒大小、分布和浓度信息, 但同样不能提供不同类型微粒的特征信息。除此之外, 傅里叶变换红外光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)和拉曼光谱(Raman Spectroscopy)技术可以区分抗体制剂中不同种类的微粒, 并且能鉴别非蛋白微粒的来源, 但仍有一些局限性, 如FTIR主要用于固体样品, 不太适用于液体样品, 并且其耗时较长; 由于蛋白质本身的荧光信号强于拉曼信号, 拉曼光谱经常受到蛋白质荧光信号的干扰等。因此, 微流成像技术(Flow Imaging Microscopy, FIM)作为一种日益流行的成像技术被广泛应用于环境科学、生物学等学科的研究中。这主要是因为微流成像技术可以对直径在1~1000 μm 的颗粒/微生物进行快速批量成像, 获得高质量的图像。流式成像仪由高倍显微镜、照相机、软件、真空泵和由真空泵控制流速的流动腔组成。注入液体后, 液体在泵的作用下以层流的形式流过微通道流通池, 而相机以较高的帧率采集不溶性微粒图像, 并对样品中不溶性微粒进行计数, 每次试验能够采集大量的不溶性微粒图像, 由于成像原理的不同, FIM在检测蛋白质颗粒等半透明颗粒时比光阻法更灵敏^[9-10], 但是如若对于FIM检测获得的大量图像数据使用人眼进行观察和分析, 则人工作业时间长, 效率较低, 且受人员专业经验差异的影响, 不易标准化。因此, 需要一种能大量采集FIM图像数据特征并对其进行分析的方法来提高图像分析效率, 近年来在图像识别领域中迅速发展的机器学习可以满足这一需求。

卷积神经网络(Convolutional Neural Network, CNN)是一类能够自主学习图像特征的人工神经网络

络,被认为可以从原始图像中学习可用于自动表征图像的最优特征^[11]。CNN推进了对宏观图像分类的分析,凭借监督学习海量图像数据的能力,革新了图像分析的许多实际应用。近年来,随着算法的进步、图形处理器的性能提升以及各领域数据集的激增,基于CNN的图像自动分类精度得到了提高^[12]。这些进展高效构建了具有多个隐含层的深度卷积神经网络。深度卷积神经网络可以在每次分类任务中利用大量数据自动学习表征图像的最优特征。近年来机器学习在疾病诊断^[13]、精准医疗^[14-15]、药物功能预测^[15-16]等方向均有不同程度的研究与应用。本研究采用了2015年的大规模视觉识别挑战赛(ImageNet Large Scale Visual Recognition Challenge, ILSVRC)中取得冠军的残差神经网络ResNet、在2017年的国际计算机视觉与模式识别会议(Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, CVPR)上提出的DenseNet,以及由旷世科技提出的ShuffleNet三种模型。ResNet^[17]是由微软研究院的何凯明、张祥雨提出的,相比于传统的CNN网络,在简单增加网络深度的时候加入残差学习,并不会引起训练时的准确率下降,该算法在人脸识别^[18]、垃圾分类^[19]等方面已有应用;DenseNet^[20]网络原理与ResNet基本相似,不同之处在于DenseNet将前面所有层作为下一层额外输入,使提取到的特征重用,提高效率,曾富亮等人将其应用在艺术图像的分类^[21]中;ShuffleNet^[22]则是一种轻量级的模型,在保证精度的同时具有较快的推理速度,在农作物病害识别^[23]和服装分类^[24]方面已有应用。

本文提出了一种基于CNN的微粒分类方法,用于识别蛋白质制剂中常见的蛋白质颗粒、硅油微滴、玻璃碎片和气泡颗粒。本研究首先制备了4类不同种类的不溶性微粒,利用微流成像仪对其进行成像,接着对图像进行分割,将图像作为神经网络的数据集,然后在CNN网络模型上进行训练和验证,以区分4类颗粒,最后将CNN模型应用于对实际样品的识别,并将识别结果与人眼识别的结果进行了比较。该研究证明了CNN可用于蛋白质制剂颗粒的分类和溯源分析。

2 材料与方法

2.1 材料

7 mL中硼硅玻璃管制注射剂瓶[肖特药品包装

(浙江)有限公司]; $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 注射用免疫球蛋白(中国食品药品检定研究院保存);磷酸盐缓冲液(pH 7.4,美国Life Technologies Corporation公司);超纯水(经直径13 mm的针式PES膜过滤器过滤);硅油(天津市瑞金特化学品有限公司)。

2.2 分析仪器

微流成像仪(FlowCAM 8100, Yokogawa Fluid Imaging Technologies, Inc.);恒温摇床(SHA-BA型,江苏科技仪器有限公司);探头式超声仪(宁波新芝生物科技有限公司);图形处理器:NVIDIA GeForce RTX3060 GPU(美国NVIDIA Corporation公司);eLabAI深度学习系统(沈阳市链接科技有限公司)。

2.3 样品制备

2.3.1 气泡的制备

将3 mL $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的注射用免疫球蛋白在7 mL中硼硅玻璃管制注射剂瓶中用移液枪进行反复大幅度吹打,产生气泡。

2.3.2 硅油液滴的制备

将硅油与超纯水混合形成硅油体积分数1%的混合物,此时溶液分为上下层,置于摇床将混合物混匀,再将混匀后溶液置于探头式超声仪(功率:120 W,频率:25 KHz)中超声30 min,溶液中形成稳定的乳白色液体,将20 μL 硅油微乳加入到4 mL超纯水和4 mL免疫球蛋白溶液中,摇床混匀10 min。

2.3.3 玻璃颗粒的制备

将中性硼硅酸盐西林瓶打碎,放入石英研钵中研磨至粉末状后,将其至于9号药典筛[(75 ± 4.1) μm]上进行振荡,得到玻璃颗粒。

2.3.4 反复冻融产生不溶性微粒

将3 mL注射用免疫球蛋白置于7 mL中硼硅玻璃管制注射剂瓶中,将其完全沉浸于液氮中冷冻,2 min后取出,置于30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热10 min。加热完毕后,再将西林瓶放于液氮中冷冻,重复6次。

2.4 微流成像检测

为了建立抗体制剂中不同微粒的神经网络图像数据集,采用微流成像仪获取上述已制备的不同不溶性微粒标准图像。微流成像仪配备长1600 μm 、宽800 μm 和深80 μm 的流通池,具有用于图像采集的10 \times 物镜。将1 mL样品缓慢加入微流成像仪中,样品为手动进样,流速为

0.15 mL · min⁻¹。自动图像速率为每秒27帧，黑色像素为15.00，白色像素为15.00。试验前，用1 mL 洗涤液洗涤流通池一次，然后用5 mL MilliQ水洗涤流通池，再使用纯水验证流通池中是否有残留颗粒。分别采集 $\geq 2 \mu\text{m}$ 、 $\geq 5 \mu\text{m}$ 、 $\geq 10 \mu\text{m}$ 、 $\geq 25 \mu\text{m}$ 、 $\geq 50 \mu\text{m}$ 的颗粒浓度和颗粒形态。

2.5 卷积神经网络

2.5.1 CNN模型结构

本研究采用的神经网络模型为ResNet50、DenseNet201和ShuffleNetV2。其中ResNet50模型网络结构由49个卷积层和1个全连接层组成，如表1所示。将49个卷积层分为5组，卷积核的大小有3种，分别为 7×7 、 1×1 、 3×3 ，用于对输入图像进行特征的提取。使用一个 7×7 的平均池化和一个 3×3 的

最大池化，每一次的池化操作都会使其维度降为原来的1/2。DenseNet201网络结构如表2所示，该模型的特点是每一层都与所有的先前层连接，作为该层的输入，实现了特征重用；DenseNet201由5个网络层连接，网络层之间通过过渡化层均匀连接，最后通过全局平均池化将最后一层的特征图池化，形成特征点，构成特征向量，向量在归一化指数函数Softmax中进行计算。ShuffleNetV2模型则如表3所示，采用24个 3×3 的卷积核进行特征的提取，进而使用 3×3 的最大池化层下采样，接着使用3个连续的模块层，再使用1024个 1×1 卷积扩充通道数，获取不同微粒的特征信息，最后再用全局池化层，防止其过拟合。

表1 ResNet50网络结构

层	输出大小	ResNet50
卷积层1	112 × 112	7 × 7
卷积层2	56 × 56	3 × 3最大池化，步长2
		$\begin{bmatrix} 1 \times 1, 64 \\ 3 \times 3, 64 \\ 1 \times 1, 256 \end{bmatrix} \times 3$
卷积层3	28 × 28	$\begin{bmatrix} 1 \times 1, 128 \\ 3 \times 3, 128 \\ 1 \times 1, 512 \end{bmatrix} \times 4$
卷积层4	14 × 14	$\begin{bmatrix} 1 \times 1, 256 \\ 3 \times 3, 256 \\ 1 \times 1, 1024 \end{bmatrix} \times 6$
卷积层5	7 × 7	$\begin{bmatrix} 1 \times 1, 512 \\ 3 \times 3, 512 \\ 1 \times 1, 2048 \end{bmatrix} \times 3$
	1 × 1	平均池化，1000D fc, Softmax

注：卷积层中矩阵，逗号前为卷积核大小，逗号后为卷积核通道数；fc 指全连接层，1000D 指该层权重矩阵的列数；Softmax 为归一化指数函数，将输入值转化为概率。

表2 DenseNet201网络结构

层	输出大小	DenseNet201
卷积	112 × 112	7 × 7，步长2
池化	56 × 56	3 × 3最大池化，步长2
密集块1	56 × 56	$\begin{bmatrix} 1 \times 1 \\ 3 \times 3 \end{bmatrix} \times 6$
转换层1	56 × 56	1 × 1
	28 × 28	2 × 2最大池化，步长2

续表 1

层	输出大小	DenseNet201
密集块2	28 × 28	$\begin{bmatrix} 1 \times 1 \\ 3 \times 3 \end{bmatrix} \times 12$
转换层2	28 × 28	1 × 1
	14 × 14	2 × 2最大池化, 步长2
密集块3	14 × 14	$\begin{bmatrix} 1 \times 1 \\ 3 \times 3 \end{bmatrix} \times 48$
转换层3	14 × 14	1 × 1
	7 × 7	2 × 2最大池化, 步长2
密集块4	7 × 7	$\begin{bmatrix} 1 \times 1 \\ 3 \times 3 \end{bmatrix} \times 32$
分类层	1 × 1	7 × 7全局平均池化
	-	1000D Fc, Softmax

注: fc 指全连接层, 1000D 指该层权重矩阵的列数; Softmax 为归一化指数函数, 将输入值转化为概率。

表3 ShuffleNetV2网络结构

层	输出大小	ShuffleNetV2
输入层	224 × 224	-
卷积层1	112 × 112	3 × 3, 步长2
最大池化	56 × 56	3 × 3, 步长2
阶段2	28 × 28	/, 步长2
	28 × 28	/, 步长1
阶段3	14 × 14	/, 步长2
	14 × 14	/, 步长1
阶段4	7 × 7	/, 步长2
	7 × 7	/, 步长1
卷积层5	7 × 7	1 × 1, 步长1
分类层	1 × 1	1 × 1, 全局平均池化
	-	1000D fc

注: 每个阶段中特征图的尺寸保持一致, 特征图尺寸变化则进入下一阶段; / 指没有卷积核; fc 指全连接层, 1000D 指该层权重矩阵的列数; Softmax 为归一化指数函数, 将输入值转化为概率。

2.5.2 CNN模型的训练

通过微流成像仪采集了蛋白质颗粒、硅油液滴、玻璃颗粒和气泡4类微粒的图片。由于神经网络输入数据大小为 $224 \times 224 \times 3$ ，所以在输入数据前使用eLabAI深度学习系统将图片裁剪为指定大小的数据，建立数据集，如表4所示，共252张图片，

其中70%作为训练数据集，30%作为验证数据集。训练过程中的模型训练参数，迭代轮数设置为10，学习率设置为0.00625，批大小为16。所有操作均在基于NVIDIA GeForce RTX3060的Windows 11操作系统上实现。

表4 4类不溶性微粒数量

数据集图片	气泡	蛋白质	玻璃	硅油
图片数/张	38	88	35	91

2.6 CNN分类模型与人眼识别的对比

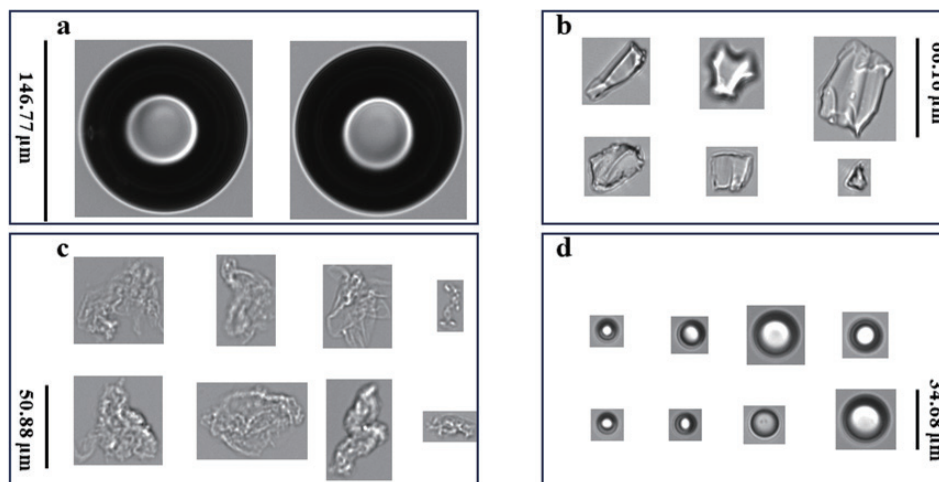
采用“2.3”项中的方法重新制备不溶性微粒，用微流成像仪采集蛋白质、硅油、玻璃、气泡4种不同类型不溶性微粒图片341张，通过人眼识别和机器学习模型对不溶性微粒图片进行分类，统计分类时间及准确性，机器学习模型对每张颗粒图片进行预测并输出预测概率，将对图片预测概率大于90%的结果认定为预测准确。

3 结果与讨论

3.1 微流成像结果

玻璃是生物制品存储和运输中常见的包装材料之一，但是在洗涤、填充以及运输过程中玻璃的磨损和损坏可能产生玻璃颗粒或碎片^[25-26]，一旦未能检测和清除，可能会对患者造成严重伤害。在由

西林瓶制备的玻璃颗粒溶液中，玻璃颗粒最显著的特征（图1b）是其相对尖锐的边缘和半透明的性质。硅油因其较低的表面张力和疏水性常用作各种容器（尤其是预充针）等的润滑剂，因在运输或使用过程中的震荡作用，硅油可从容器表面脱落到药物制剂中形成液滴^[27]，蛋白样品吸附到硅油-水界面上，增加了产生聚集体的可能性^[28]，图1d显示了硅油呈半透明中心的球形微液滴状。气泡在蛋白质制剂的生产等各环节中都很容易形成，如过滤、搅拌、运输及灌装过程，如图1a显示，气泡一般为边界明显的同心圆。图1c是经反复冻融处理的蛋白质颗粒，蛋白质颗粒最显著的特征是其半透明性和不规则的形状。



a. 气泡；b. 玻璃；c. 蛋白质颗粒；d. 硅油液滴。

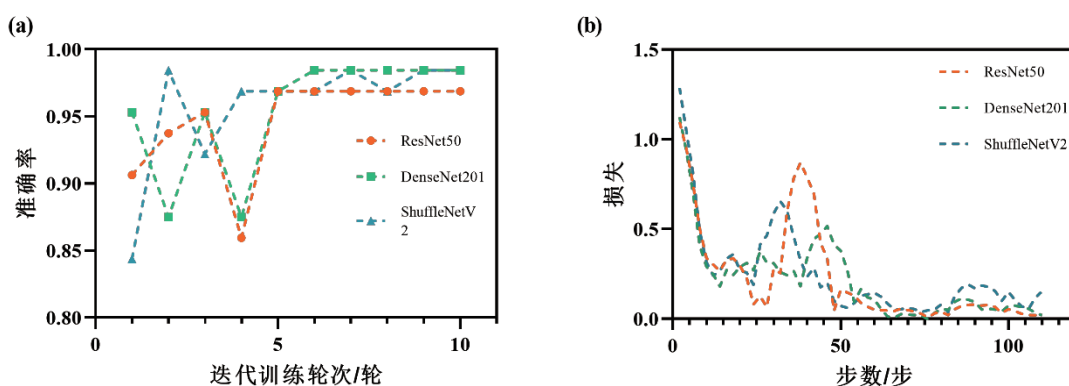
图1 4类不溶性微粒图片

3.2 模型训练结果

CNN的结构由三部分组成：卷积层、池化层和全连接层。卷积层的作用主要是提取图片特征，将图像作为矩阵输入到CNN后，图像矩阵经过各种滤波器生成不同的特征图，从而得到不同的图像特征。池化层的目的是对特征图进行下采样，因为经过卷积层之后的图片，维度较大，经过下采样可以减少待处理图中的元素数量，下采样时保留的是图像最显著的特征。全连接层在CNN中扮演分类器的角色，其中卷积层和池化层将输入图像映射到特征空间，全连接层将这些特征映射到样本标记空间。

为了体现所选择的3类CNN模型的有效性，对3类CNN模型在数据集上的准确度（Accuracy）和损失（Loss）的试验结果进行比较，如图2所示。3类模型均具有较高的准确率，其中ResNet50在Epoch（迭代轮次，即所有训练数据被训练的轮次）=5时准确度为最优，最优值为0.9688；

DenseNet201在Epoch=6时准确度最优，达到0.9844；ShuffleNetV2则在Epoch=2时准确度最优，最优值为0.9844。就准确率指标而言，DenseNet201和ShuffleNetV2均优于ResNet50，但ResNet50和DenseNet201在第6个Epoch后则趋于稳定，ShuffleNet在训练过程中较不稳定。3类模型训练过程中的损失均较低，拟合能力较强，在Step（步数，即所有训练数据被训练一轮所需要的迭代步数）=60后，损失均低于0.1，ResNet50损失最低可达0.007696，DenseNet201损失最低值为0.0014613，ShuffleNetV2最低则达到0.0005428；但如图2（b）所示，ShuffleNetV2损失稳定性较差，在Step=80后相比于其他两者有较大的波动。综合不同微粒图像分类训练的准确率和损失来看，卷积网络模型DenseNet201相比于其他两者学习效果最好，更适用于不溶性微粒的分类，但ResNet50和ShuffleNetV2仍然具有一定的适用性。



a. 表示准确率；b. 表示损失。

图2 CNN模型比较

为了评估所训练的不同CNN模型对于不同颗粒的分类性能，将训练好的3个网络模型用于不同不溶性微粒的分类测试，采用已切分好的验证数据集进行测试，图3所示为不同模型测试结果的混淆矩阵，可以利用混淆矩阵推导出不同的度量来表示模型的性能，能很好地展示不同微粒的类型和分布。

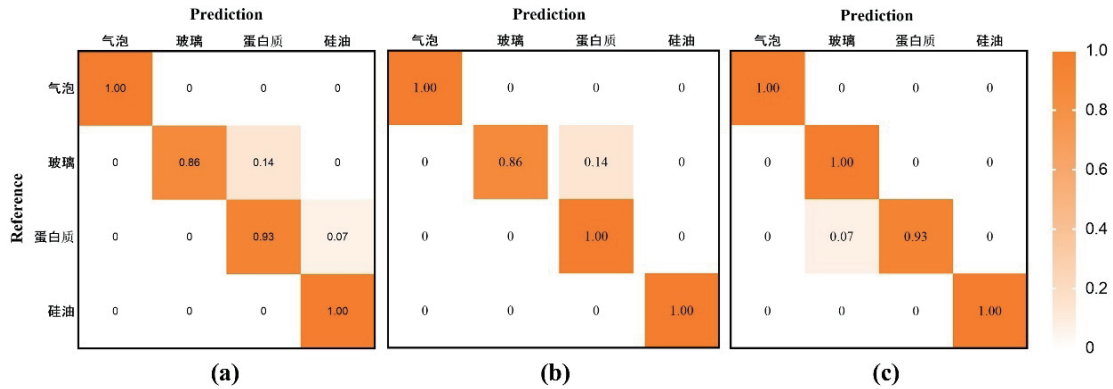
ResNet50模型对4类不同颗粒的分类准确度为96%；具体针对每一类粒子，其中对气泡和硅油的识别准确度在100%，而对玻璃碎片和蛋白质的识别准确度相对较低，有可能将玻璃碎片误识别为蛋白质，将蛋白质误识别为硅油。DenseNet201模型

对4类不同颗粒的分类准确度为98%；气泡、硅油和蛋白质颗粒全部都被正确分类，但将部分玻璃碎片误识别为蛋白质，与ResNet50出现类似的情况，这可能与蛋白质颗粒的透明度相关。混淆矩阵表明ShuffleNetV2对4类不同颗粒的分类准确度为98%；气泡、玻璃和硅油被完全正确分类，部分蛋白质被分类为玻璃碎片。

结果表明，在使用3个模型对4类颗粒的特征学习训练后，总体而言，可以实现96%以上的不同类型颗粒的准确识别，具有较高的准确率，表明3个模型对不同微粒颗粒识别的可行性。但3个CNN模型对于不同微粒的分类都出现玻璃和蛋白质的识

别错误问题，这可能与个别微粒的形态有关，并且蛋白质微粒与玻璃碎片颗粒在透明度上有一定的相似性，所以模型识别错误。后续可通过扩充训练集

中图片数量、增加模型训练轮次等方式，进一步优化模型。



a. ResNet50; b. DenseNet201; c. ShuffleNetV2。

图3 各 CNN 模型预测混淆矩阵

除准确率外，本文还采用了分类精确率 (Precision)、召回率 (Recall)、 F 值 ($F1$ -score) 和 ROC 曲线下面积 (AUC) 对模型进行评估。

以预测蛋白质为例，精确率表示在所有被预测为蛋白质的样本中预测正确的比例，用此标准来评估预测为蛋白质的精确性。召回率则是在所有实际为蛋白质的样本中，被预测为蛋白质的比例，评估所有实际为蛋白质样本被预测出来的数量占比。二者定义如下：

$$\text{Precision} = \frac{TP}{TP + FP} \quad (1)$$

$$\text{Recall} = \frac{TP}{TP + FN} \quad (2)$$

其中 TP ：实际为真，预测也为真的样本数； FN ：实际为真，预测为假的样本数； FP ：实际为假，预测为真的样本数。

F 值是精确率和召回率的复合，是两者的调和平均值，定义如下：

$$F = 2 \times \frac{\text{Precision} \times \text{Recall}}{\text{Precision} + \text{Recall}} \quad (3)$$

ROC 曲线能反映模型在选取不同阈值的时候敏感性和精确性的趋势。AUC 通常用于评估 ROC 曲线，并提供跨所有可能的分类阈值性能的综合度量，AUC 值范围为 0~1，一般来说，AUC 值越接近 1，模型的准确性越好。

表 5 列出了识别每一类颗粒的精确率、召回率、 F 值和 AUC 值。

表5 测试集上各模型精确率、召回率、 F 和 AUC 值比较

类别	颗粒类型	精确率	召回率	F	AUC
ResNet50	硅油	0.9545	1.0000	0.9767	1.0000
	蛋白质	0.9286	0.9286	0.9286	0.9980
	玻璃	1.0000	0.8571	0.9231	1.0000
	气泡	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
DenseNet201	硅油	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	蛋白质	0.9333	1.0000	0.9655	0.9960
	玻璃	1.0000	0.8571	0.9231	0.9967
	气泡	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

续表 5

类别	颗粒类型	精确率	召回率	<i>F</i>	AUC
ShuffleNetV2	硅油	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	蛋白质	1.0000	0.9286	0.9630	0.9960
	玻璃	0.8750	1.0000	0.9333	0.9934
	气泡	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

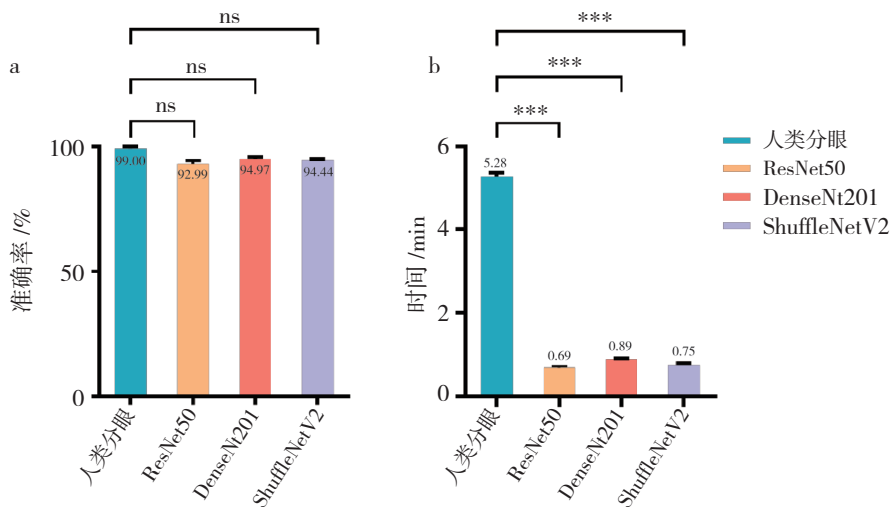
从表5可以看到，ResNet50模型对各个颗粒类型识别均达到了92%以上的高精密度；DenseNet201模型和ShuffleNetV2模型对不同颗粒识别的精确率和召回率均为较高水平，前者除蛋白质外对其他类型微粒的识别精确率均为100%，后者除玻璃颗粒外对其他类型颗粒的识别精确率也均为100%，具有较高的精确率。当使用*F*值来衡量精确率和召回率时，各个类别的*F1-score*也均达到92%以上，和精确率的趋势基本保持一致。为了避免单纯从精确率和召回率评估模型可能带来的问题，引入了AUC，各个颗粒类型的AUC值均达到了99%以上，和精确率等的趋势保持一致。总的来说，综合考虑精确率、召回率、*F*值和AUC证明了模型的可用性，经过训练的3类CNN模型在对4类不同形态颗粒的区分上均具有较高的性能，基本实现了对4类颗粒的形态区分，综合比较其性能和稳定性，DenseNet201和ShuffleNetV2模型在性能上要优于ResNet50，DenseNet201稳定性优于ShuffleNetV2，因而在选用的3类CNN模型对于不同类型不溶性微

粒的分类识别中，DenseNet201模型为最佳，但其余两者仍具有适用性。

3.3 CNN分类模型与人眼识别的比较

采用CNN模型和人眼识别对新制备的4种不溶性微粒图片的混合样品进行分类识别，比较CNN分类模型与人眼识别两类分类方法的识别准确性和识别时间。如图4所示，3种CNN模型与人眼识别相比，两者的准确性无显著差异，但3种CNN模型识别图片所需时间均显著少于人眼分类，因此采用CNN模型对不溶性微粒进行分类识别可在不影响分类准确性的前提下，极大地提高分类效率。

虽然微流成像技术可采集不溶性微粒图片，为从形态学对微粒进行分类识别提供了基础数据和可能性，但如何对其进行分类并无统一共识，具有一定挑战性。在不采用分离鉴定或染色等技术的单纯的图像识别中，人眼分类结果具有较高可信度，但对人员专业能力要求较高，并且面对海量图片时基本无法采用人眼识别完成分类，因此CNN模型在不溶性微粒分类的应用上具有明显优势。



a. 表示识别准确率；b. 表示识别时间；用单因素方差分析法进行分析，***表示差异极其显著 ($P < 0.001$)，**表示差异极显著 ($P < 0.01$)，*表示差异显著 ($P < 0.05$)，ns表示无显著差异 ($P > 0.05$)。

图4 分类方法实际对比结果

4 结论与展望

本研究基于3种CNN模型：ResNet50、DenseNet201、ShuffleNetV2，对微流成像采集的玻璃、硅油、气泡、蛋白质4种不溶性微粒图片进行分类建模及评估，即分别对制备的4种不同类型单一颗粒图像建立数据集，并采用测试数据集对模型进行测试，预测准确率均达96%以上；其他的评价指标如精确率、召回率、*F*值和AUC，都支持模型的适用性。通过对3类模型的训练和测试结果的对比，DenseNet201在不同不溶性微粒图片识别中比其余两者具有较高准确率和稳定性。通过对人眼识别和3种CNN模型识别准确率和识别速度进行对比，CNN模型具有更高的识别准确率和更快的识别速度。因此，可利用其对蛋白制剂实际生产、运输、储存、使用等过程中产生的4类不溶性微粒进行快速区分，从而结合各类不溶性微粒产生的原因对其进行溯源分析，优化制剂工艺，减少不溶性微粒的产生。未来可增加训练模型中不溶性微粒的数量，提高其识别准确性，从而提升药品质量控制的效率。此外，本试验中仅使用了4种类型颗粒，能够区分的不溶性微粒种类有一定局限性，在未来也会探索更多的不溶性微粒类型，用更多类型微粒图像完善训练集并扩充模型效能，提高对于蛋白制剂生命周期各环节中产生各类型微粒的可能情况的适用性。

综上，机器学习可应用于识别不溶性微粒图像，为不同类型颗粒的分类提供一种具有较高测试精度的分类工具，可尝试用于各类蛋白质药物制剂的检验检测和质量分析，提高检验检测和质量分析的精细程度和工作效率，在药品质量评估和控制方面有良好的应用前景。

参考文献：

- [1] 郭莎, 贾哲, 吴昊, 等. 单克隆抗体颗粒表征的现状与挑战[J]. 中国药事, 2022, 36(2): 161-169.
- [2] Joubert MK, Hokom M, Eakin C, et al. Highly Aggregated Antibody Therapeutics Can Enhance the in Vitro Innate and Late-stage T-cell Immune Responses[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(30): 25266-25279.
- [3] Kotarek J, Stuart C, De Paoli SH, et al. Subvisible Particle Content, Formulation, and Dose of an Erythropoietin Peptide Mimetic Product Are Associated with Severe Adverse Postmarketing Events[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 105(3): 1023-1027.
- [4] Singh SK, Afonina N, Awwad M, et al. An Industry Perspective on the Monitoring of Subvisible Particles as a Quality Attribute for Protein Therapeutics[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 99(8): 3302-3321.
- [5] Wu H, Chisholm CF, Puryear M, et al. Container Surfaces Control Initiation of Cavitation and Resulting Particle Formation in Protein Formulations after Application of Mechanical Shock[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 109(3): 1270-1280.
- [6] United States Pharmacopeial Convention. USP <1787> Measurement of Subvisible Particulate Matter in Therapeutic Protein Injections[S]. 41st ed, 2018.
- [7] Wang W, Nema S, Teagarden D. Protein Aggregation—Pathways and Influencing Factors[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2010, 390(2): 89-99.
- [8] Akhuzada ZS, Hubert M, Sahin E, et al. Separation, Characterization and Discriminant Analysis of Subvisible Particles in Biologics Formulations[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 20(3): 232-244.
- [9] Demeule B, Messick S, Shire SJ, et al. Characterization of Particles in Protein Solutions: Reaching the Limits of Current Technologies[J]. The AAPS Journal, 2010, 12(4): 708-715.
- [10] Zölls S, Weinbuch D, Wiggenhorn M, et al. Flow Imaging Microscopy for Protein Particle Analysis—a Comparative Evaluation of Four Different Analytical Instruments[J]. The AAPS Journal, 2013, 15(4): 1200-1211.
- [11] LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep Learning[J]. Nature, 2015, 521(7553): 436-444.
- [12] Rawat W, Wang Z. Deep Convolutional Neural Networks for Image Classification: A Comprehensive Review[J]. Neural Computation, 2017, 29(9): 2352-2449.
- [13] 陈泽山, 朱文琳, 李玉莲, 等. 神经网络在肝癌相关研究中的应用现状[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(8): 623-627, 634.
- [14] 简俊明. 面向医学图像的机器学习方法研究及在卵巢癌精准诊断中的应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021.
- [15] 言方荣. 人工智能在生物医药领域中的应用和进展[J].

- 中国药科大学学报, 2023, 54 (3): 263-268.
- [16] 池燕飞, 李春, 冯旭东. 机器学习在蛋白质功能预测领域的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39 (6): 2141-2157.
- [17] He K, Zhang X, Ren S, et al. Deep Residual Learning for Image Recognition[C]//IEEE. Proceedings on the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. Las Vegas, NV, USA, 2016: 770-778.
- [18] 谢鑫. 基于ResNet50的人脸识别模型[J]. 科技资讯, 2020, 18 (35): 9-11.
- [19] 张大明, 蔡学森, 蒋仕东, 等. 基于Resnet50的垃圾分类系统[J]. 电脑编程技巧与维护, 2022 (9): 24-27.
- [20] Huang G, Liu Z, Pleiss G, et al. Convolutional Networks with Dense Connectivity[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 2022, 44 (12): 8704-8716.
- [21] 曾富亮, 胡文瑾, 何国源, 等. 基于 DenseNet 的唐卡图像分类[J]. 现代电子技术, 2022, 45 (6): 153-157.
- [22] Ma N, Zhang X, Zheng HT, et al. ShuffleNet V2: Practical Guidelines for Efficient CNN Architecture Design[C]//ECCV: European Conference on Computer Vision. Munich, Germany, 2018: 122-138.
- [23] 李好, 邱卫根, 张立臣. 改进ShuffleNet V2的轻量级农作物病害识别方法[J]. 计算机工程与应用, 2022, 58 (12): 260-268.
- [24] 曾华福, 杨杰, 李林红. 基于改进ShuffleNet v1的服装图像分类算法[J]. 现代纺织技术, 2023, 31 (2): 23-35.
- [25] Narhi LO, Chou DK, Christian Twinkle R, et al. Stress Factors in Primary Packaging, Transportation and Handling of Protein Drug Products and their Impact on Product Quality[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022, 111 (4): 887-902.
- [26] Sacha GA, Saffell-Clemmer W, Abram K, et al. Practical Fundamentals of Glass, Rubber, and Plastic Sterile Packaging Systems[J]. Pharmaceutical Development and Technology, 2010, 15 (1): 6-34.
- [27] Dias J ú nior C de, Cardoso AL, Figueiredo AG, et al. Agitation of the Syringe and Release of Silicone Oil[J]. Eye, 2020, 34 (12): 2242-2248.
- [28] Kannan A, Shieh IC, Negulescu PG, et al. Adsorption and Aggregation of Monoclonal Antibodies at Silicone Oil-Water Interfaces[J]. Molecular Pharmaceutics, 2021, 18 (4): 1656-1665.

(收稿日期 2023年8月17日 编辑 王雅雯)