

附表 4.

小分子初赛实验测试流程与评分规则

一、入围阶段（高通量初筛）

利用酶标仪等药物筛选设备，通过基于蛋白探针 Glosensor 的 cAMP 检测实验对所有候选分子进行初筛。该实验可表征小分子对胞内 cAMP 相对含量的影响，间接反映小分子对 HCAR1 的拮抗活性。具体评价流程为：

对所有候选分子进行双浓度的筛选，高浓度设定为 30 μM ，低浓度设定为 10 μM 。基于筛选结果：①在两种浓度中均无明显拮抗活性的分子将被认为是无拮抗活性分子，不计入效应排名；②在高浓度存在拮抗活性而在低浓度无拮抗活性的分子将被认为是低拮抗活性分子；③在低浓度存在拮抗活性而高浓度无拮抗活性，或在低浓度与高浓度中均存在拮抗活性的分子被认为是具有潜在拮抗活性的分子，按照低浓度的拮抗效能进行从高到低排序。

参赛团队需知悉：在遴选入围分子时，该环节通过综合考察参赛分子的双浓度检测结果，降低了假阳性分子入围事件；但仍有可能存在较低概率的假阴性分子**淘汰事件**。为最大程度的保证优质分子被发现，入围规则按下述条例实施：

（1）根据③中按拮抗效能强弱的排序结果，取前 100 名分子入围比赛；与第 100 名入围分子的拮抗活性无显著性差异的分子，一并入围。

（2）若存在某参赛团队提交的全部分子均未能入围的

情况，该队伍在结果公示后的 7 个工作日内，可向主办方申请仅 1 个分子的无差别入围，但该条例不适用于已有分子入围的队伍。上述阶段由华东师范大学和上海药物所相关团队开展独立湿实验验证。

二、初评阶段（拮抗活性确证及初步评比）

利用酶标仪等药物筛选设备，基于 Glosensor cAMP 实验对所有候选分子进行多浓度的拮抗活性检测，并拟合小分子对 HCAR1 的量效曲线，并按半数拮抗浓度（IC₅₀）作为评价依据形成检测结果，对除无拮抗活性或低拮抗活性分子以外的其他分子，按照 IC₅₀ 数据，从低到高排序，前 10 支参赛团队进入复审环节，主办方根据湿实验结果对小分子进行排序评分；上述阶段由华东师范大学和上海药物所相关团队开展独立湿实验验证。

三、复审阶段 1（拮抗活性评价）

基于 HTRF cAMP 实验对入围初评的小分子进行拮抗活性评价。该实验通过对胞内 cAMP 水平进行高灵敏度的定量检测，能够更精确地反映小分子对 HCAR1 的拮抗活性，相较于 Glosensor cAMP 实验具有更高的检测精度。此外，HTRF 利用荧光共振能量转移原理，不仅能够实现 cAMP 浓度的精确定量，还具有更高的信噪比和更低的非特异性背景干扰，能够提供更稳定可靠的结果。因此，HTRF cAMP 实验的检测结果将作为复审排名的重要依据。具体评价流程为：

对入围初评的所有分子进行多浓度的拮抗活性检测，

每个分子的检测将由华东师范大学和上海药物所独立开展，并按 IC_{50} 作为评价依据形成最终检测结果。根据 IC_{50} 检测结果，对相关分子进行排序。

具体评价流程：

对所有进入复审阶段的分子进行多浓度检测，并拟合小分子对 HCAR1 的量效曲线，并对 IC_{50} 从低到高进行拮抗活性排序。根据拮抗活性排序结果，

1. 排名前 5 者，按下表获得拮抗活性积分，并进入亚型选择性测试环节；

拮抗活性排名 (IC_{50} 从低到高)	拮抗活性积分
1	100
2	90
3	85
4	80
5	75

2. 若存在与 **第 5 名** 的 IC_{50} 无显著性差异的分子，一并共享第 5 名，并获得相同积分（75 分）；

3. 若存在 **相邻排名** 分子的 IC_{50} 无显著性差异的情况，则相关分子共享最高排名的名次，并获得 **原积分求和后的平均值**。如：原排名第 1、第 2 和第 3 的三个分子的 IC_{50} 无显著性差异，则这三个分子的实际排名均为第 1 名，所获得拮抗活性积分为 $(100+90+85)/3=91.67$ 分，第 4 名不受影响，仍为 80 分。

四、复审阶段 2（选择性评价）

对于获得拮抗活性积分的分子，进一步检测其对 HCAR2 等其他 GPCR 家族成员的拮抗活性。具体流程为：

对所有进入亚型选择性评价环节的分子进行多浓度检测，并拟合小分子对 HCAR1 以及 HCAR2 等其他 GPCR 家族成员的量效曲线，计算该化合物对 HCAR1 的 IC_{50} 值（定义为 A）以及对 HCAR2 等其他 GPCR 家族成员的 IC_{50} 值（定义为 B）。B 与 A 的比值 (B/A) < 10 的分子被认为是 HCAR1 低特异性拮抗剂； $B/A > 1000$ 的分子被认为是 HCAR1 高特异性拮抗剂。将 B/A 从高到低进行排序，根据选择性排序结果，排名前 5 者按下表获得选择性积分。

对 HCAR1 的选择性排名 (B/A 从高到低)	选择性积分
1	100
2	90
3	80
4	70
5	60

五、初赛总得分（积分加权求和）

按如下规则对各环节生成的积分赋予不同比例的权重：

条目	权重 (%)
拮抗活性积分	80
选择性积分	20

总得分 = (拮抗活性积分) * 80% + (选择性积分) * 20%。

六、注意事项

1. 同一支参赛团队如果推荐了多个分子，则只考虑拮抗活性最高的分子予以授奖。即不同奖项不可兼得，例如获得“一等奖”的参赛团队所推荐的其余分子不可再兼得“三等奖”。

2. 对于入围环节可能存在的假阴性事件，参赛团队需要知悉，假阴性事件的发生：①不属于主办方主观意愿；②不属于主办方的检测失误；③属于高通量筛选过程中不可避免的低概率事件。

3. 主办方已在《初赛实验测试流程与评分规则》-入围环节的部分中明确说明“若存在某参赛团队提交的全部分子均未能入围的情况，该队伍在结果公示后的 7 个工作日内，可向主办方申请仅 1 个分子的无差别入围”。主办方**不接受**任何形式的入围分子**替换申请**，并将对一切违背赛事初衷的行为**予以警告**。参赛团队在该环节（可能）产生的任何费用，由**参赛团队自行承担**。在附件 3.4《测试流程与评分》实施后，该环节（可能）产生的任何与假阴性有关事件，主办方**不承担任何责任**，参赛团队**无权**向主办方追责。

4. 参赛团队若对初评环节后任一环节的结果（含初评环节的结果）存在合理性质疑，需向主办方报备后，向主办方**指定的第三方机构**进行重新检测，并在相应环节结果公示后的**7 个工作日内**向主办方提交检测结果。主办方将

参考第三方机构出示的检测结果，若出现可能影响该分子最终获奖的情况，主办方将对该分子进行复测。根据主办方的复测结果，**仅在影响该分子最终获奖的情况下**，由主办方承担**第三方机构的检测费用**；否则，由参赛团队自行承担。