

附件 4.小分子赛道实验测试流程与评分规则

小分子赛道实验测试流程与评分规则

一、初筛环节（高通量初筛）

利用 Thermofluor ABI : 7500 Fast 设备，通过热移位分析（Thermal Shift Assay, TSA）技术，快速筛选出能与目标蛋白 HSV DNA 聚合酶（HSV Pol）结合、显著提高其热稳定性的小分子化合物。具体评价流程如下：

对所有候选小分子在 100 μ M 浓度条件下，与 HSV Pol 野生型（WT）蛋白进行共孵育，每批次实验均设置空白对照组（仅含蛋白、不含小分子）。利用荧光定量 PCR 仪或酶标仪进行梯度升温检测，实时监测蛋白折叠过程中荧光信号变化，并绘制熔解曲线以获得蛋白熔解温度（ T_m ）。基于检测结果，计算候选小分子相对于空白对照组的熔解温度变化值（ ΔT_m ）。其中， $\Delta T_m \geq 2^\circ\text{C}$ 的候选小分子参与初赛候选分子排名（作为参考，阳性药物 ACV-TP 和 Foscarnet 的 ΔT_m 分别 $> 4^\circ\text{C}$ 和 $> 7^\circ\text{C}$ ）。

参赛团队需知悉：在初筛环节遴选分子时，TSA 筛选可有效降低后续实验成本并减少假阳性，但可能存在一定比例的假阴性分子被淘汰。为最大程度地保证优质分子被发现，初筛规则按下述规则实施：

（1）对 $\Delta T_m \geq 2^\circ\text{C}$ 的候选小分子按 ΔT_m 从高到低排序，取前 100 名候选小分子进入初评环节；若满足 $\Delta T_m \geq 2^\circ\text{C}$ 条件的候选小分子不足 100 个，则满足条件的候选小分子全部进入初评环节。

(2) 若存在某参赛团队提交的全部分子均未能进入初评环节的情况，该参赛团队在结果公示后的 7 个工作日内，可向主办方申请 1 个参赛分子直接进入初评环节，但该规则不适用于已有分子进入初评环节的参赛团队。上述阶段由上海大学和上海市重大传染病和生物安全研究院相关团队开展独立湿实验验证。

二、初评环节（WT 抑制活性确证及初步评比）

利用体外 DNA 聚合酶活性检测体系，对初筛得到的候选小分子开展 IC₅₀ 功能活性验证，定量评估其对 HSV Pol WT 蛋白活性的抑制能力。通过优化蛋白浓度以保证检测信噪比稳定，并进行多浓度梯度抑制实验，利用酶标仪监测荧光信号变化以反映酶活水平。随后对检测数据进行剂量-效应曲线拟合，计算半数抑制浓度（IC₅₀）。根据 IC₅₀ 结果对候选小分子从低到高进行排序，并按排名择优遴选化合物前 10 名所在参赛团队进入复评环节，由主办方依据湿实验结果进行综合评分；上述阶段由上海大学和上海市重大传染病和生物安全研究院相关团队开展独立湿实验验证。

1. 排名前 10 者，按下表获得抑制活性积分，并进入复评环节；

抑制活性排名 (IC ₅₀ 从低到高)	抑制活性积分 (WT)
1	100
2	95
3	90
4	85
5	80
6	75
7	70
8	65
9	60
10	55

2.若存在相邻排名分子的 IC₅₀ 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 IC₅₀ 无显著性差异，则这三个分子的实际排名均为第 1 名，所获得积分为 (100 + 95 + 90) / 3 = 95 分，第 4 名不受影响，仍为 85 分。

三、复评环节 1（W781V 耐药突变体抑制活性评价）

对通过初赛的候选小分子，在 HSV Pol 耐药突变体 W781V 上进行多浓度梯度 IC₅₀ 检测，验证小分子对突变体蛋白的抑制活性，考察小分子对 W781V 突变型 HSV Pol 的作用效果，为后续晋级和分子优化提供依据，同时作为决赛得分的重要组成部分。具体评价流程为：

对进入复评环节的 10 个候选小分子，在 HSV Pol 耐药突变体 W781V 体系中开展 IC₅₀ 功能活性验证。采用与初评环节一致的多浓度梯度进行抑制实验，以确保数据可比性。实验过程中利用酶标仪监测核酸合成相关荧光信号变化，评估小分子对 W781V 突变体的抑制效果。随后对实验数据进行剂量-效应曲线拟合，计算各分子的 IC₅₀ 值。根据 IC₅₀ 检测结果，对相关候选小分子进行排序。

对所有进入复评环节的候选小分子进行多浓度检测，并拟合小分子对 HSV Pol 耐药突变体 W781V 的量效曲线，并对 IC₅₀ 从低到高进行抑制活性排序。

1.排名前 5 者，按下表获得抑制活性积分；

抑制活性排名 (IC ₅₀ 从低到高)	抑制活性积分（W781V）
1	100
2	95
3	90
4	85
5	80

2.若存在与第 5 名的 IC_{50} 无显著性差异的候选小分子，一并共享第 5 名，并获得相同积分（80 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，所获得积分为 $(100 + 95 + 90) / 3 = 95$ 分，第 4 名不受影响，仍为 85 分。

四、复评环节 2（N815S 耐药突变体抑制活性评价）

对通过初赛的小分子，在 HSV Pol 突变体 N815S 上进行多浓度梯度 IC_{50} 检测，验证小分子对突变体蛋白的抑制活性，考察小分子对 N815S 突变型 HSV Pol 的作用效果，为后续晋级和分子优化提供依据，同时作为决赛得分的重要组成部分。具体评价流程为：

对进入复评环节的 10 个候选分子，在 HSV Pol 耐药突变体 N815S 体系中开展 IC_{50} 功能活性验证。采用与初评环节一致的多浓度梯度进行抑制实验，以确保数据可比性。实验过程中利用酶标仪监测核酸合成相关荧光信号变化，评估小分子对 N815S 突变体的抑制效果。随后对实验数据进行剂量-效应曲线拟合，计算各分子的 IC_{50} 值。根据 IC_{50} 检测结果，对相关分子进行排序。

对所有进入复评环节的进行多浓度检测，并拟合小分子对 HSV Pol 耐药突变体 N815S 的量效曲线，并对 IC_{50} 从低到高进行抑制活性排序。

1.排名前 5 者，按下表获得抑制活性积分；

抑制活性排名 (IC_{50} 从低到高)	抑制活性积分（N815S）
1	100

2	95
3	90
4	85
5	80

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（80 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，所获得积分为 $(100 + 95 + 90) / 3 = 95$ 分，第 4 名不受影响，仍为 85 分。

五、复评环节 3（Y941H 耐药突变体抑制活性评价）

对进入复评环节的 10 个候选分子，在 HSV Pol 突变体 Y941H 上进行多浓度梯度 IC_{50} 检测，验证小分子对突变体蛋白的抑制活性，考察小分子对 Y941H 突变型 HSV Pol 的作用效果，为后续晋级和分子优化提供依据，同时作为决赛得分的重要组成部分。具体评价流程为：

对进入复评环节的候选分子，在 HSV Pol 耐药突变体 Y941H 体系中开展 IC_{50} 功能活性验证。采用与初评环节一致的多浓度梯度进行抑制实验，以确保数据可比性。实验过程中利用酶标仪监测核酸合成相关荧光信号变化，评估小分子对 Y941H 突变体的抑制效果。随后对实验数据进行剂量-效应曲线拟合，计算各分子的 IC_{50} 值。根据 IC_{50} 检测结果，对相关分子进行排序。

对所有进入复评环节的分子进行多浓度检测，并拟合小分子对 HSV Pol 耐药突变体 Y941H 的量效曲线，并对 IC_{50} 从低到高进行抑制活性排序。

1.排名前 5 者，按下表获得抑制活性积分；

抑制活性排名 (IC ₅₀ 从低到高)	抑制活性积分 (Y941H)
1	100
2	95
3	90
4	85
5	80

2.若存在与第 5 名的 IC₅₀ 无显著性差异的分子，一并共享第 5 名，并获得相同积分（80 分）；

3.若存在相邻排名分子的 IC₅₀ 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 IC₅₀ 无显著性差异，则这三个分子的实际排名均为第 1 名，所获得积分为 $(100 + 95 + 90) / 3 = 95$ 分，第 4 名不受影响，仍为 85 分。

六、复评总得分（积分加权求和）

1. 对于复评环节的 10 个候选小分子，按下表获得初筛环节所测基于蛋白热稳定性变化的相互作用评分：

基于蛋白热稳定性变化的相互作用排名 (ΔT_m 从高到低)	基于蛋白热稳定性变化的相互作用积分 (WT)
1	100
2	95
3	90
4	85
5	80
6	75
7	70
8	65
9	60
10	55

2. 若存在相邻排名候选小分子的 ΔT_m 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 的三个候选小分子的 ΔT_m 无显著性差异，则这三个分子的实际排名均为第 1 名，所获得积分为 $(100 + 95 + 90) / 3 = 95$ 分，第 4 名不受影响，仍为 85 分。

3. 按如下规则对各环节生成的积分赋予权重：

条目	权重 (%)
抑制活性积分 (WT)	20
抑制活性积分 (W781V)	20
抑制活性积分 (N815S)	20
抑制活性积分 (Y941H)	20
基于蛋白热稳定性变化的相互作用积分 (WT)	20

总得分 = 抑制活性积分 (WT) * 20% + 抑制活性积分 (W781V) * 20% + 抑制活性积分 (N815S) * 20% + 抑制活性积分 (Y941H) * 20% + 基于蛋白热稳定性变化的相互作用积分 (WT) * 20%。

七、注意事项

1. 同一支参赛团队如果推荐了多个候选小分子，则只考虑总得分最高的候选小分子予以授奖。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候选小分子不可再兼得“三等奖”。

2. 对于初筛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事件。

3. 主办方已在本规则初筛环节的部分中明确说明“若存在某参赛团队提交的全部参赛分子均未能进入初评环节的情况，该参赛团队在结果公示后的 7 个工作日内，可向主办方申请 1 个候选小分子直接进入初评环节”。主办方不接受任何形式的初评候选小分子替换申请，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。在本规则实施后，该环节（可能）产生的任何与假阴性有关事件，主办方不承担任何超出赛事规则约定范围之外的责任，参赛团队无权向主办方追责。

4. 参赛团队若对初评环节及后续任一环节的结果存在合理质疑，需向主办方报备后，委托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，若出现可能影响该候选小分子最终获奖的情况，主办方将对该候选小分子进行复测。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。