



AL MAGNIFICO RETTORE
DELL'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

COD. ID: 5733

Il sottoscritto chiede di essere ammesso a partecipare alla selezione pubblica, per titoli ed esami, per il conferimento di un assegno di ricerca presso il Dipartimento di **Scienze Farmaceutiche**.

Responsabile scientifico: **Prof. Giovanni Grazioso**

Enrico Mario Alessandro Fassi

CURRICULUM VITAE

INFORMAZIONI PERSONALI

Cognome	FASSI
Nome	ENRICO MARIO ALESSANDRO
Data di Nascita	19 GIUGNO 1992

ISTRUZIONE E FORMAZIONE

Titolo	Corso di studi	Università	Anno conseguimento titolo
Laurea Magistrale a Ciclo Unico	FARMACIA (LM-13)	Università degli Studi di Milano	2017
Abilitazione all'esercizio della professione di Farmacista	<i>Esame di Stato</i>	Università degli Studi di Milano	2017
Corso di Perfezionamento (116 ore - 17 CFU)	Gestione della Proprietà Intellettuale	Università degli Studi di Milano	2021
Dottorato di Ricerca	SCIENZE FARMACEUTICHE	Università degli Studi di Milano	2023

LINGUE STRANIERE CONOSCIUTE

Lingue	Livello di conoscenza
INGLESE	B2 (Listening: C1, Reading: C1, Writing: B2, Speaking: B2) - certificato IELTS 2019



PREMI, RICONOSCIMENTI E BORSE DI STUDIO

Anno	Descrizione premio
2018	Assegno di ricerca presso l'Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche (ICRM-CNR, ora CNR-SCITEC)

ATTIVITÀ DI FORMAZIONE O DI RICERCA

Attività di Formazione:

1) Laurea Magistrale in FARMACIA (15/03/2017), Università degli Studi di Milano, votazione 103/110. Tesi sperimentale (durata totale, 1 anno) svolta inizialmente per 9 mesi presso l'Institute for Research in Biomedicine (IRB) di Bellinzona (Svizzera) e per i restanti 3 mesi presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Milano.

2) Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche (27/03/2023), Università degli Studi di Milano. Durante il periodo di dottorato, ho svolto un periodo di 6 mesi all'estero presso l'Institute for Research in Biomedicine (IRB) di Bellinzona (Svizzera).

Attività di Ricerca:

3) Stagiaire (01/06/2017 - 31/03/2018), Institute for Research in Biomedicine (IRB) di Bellinzona (Svizzera).

4) Assegno di Ricerca (03/04/2018 - 30/09/2019), Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche (ICRM-CNR, ora CNR-SCITEC).

Argomenti di ricerca e competenze acquisite:

1) Tesi Magistrale - Institute for Research in Biomedicine (Svizzera) / Università degli Studi di Milano
"Studi computazionali su HMGB1 e progettazione di peptidi con attività inibitoria"

Durante il periodo di tesi magistrale, trascorso prevalentemente nel laboratorio del Dr. Andrea Cavalli (Group Leader del Computational Structural Biology Lab), ho imparato ed applicato numerose metodiche computazionali (Docking, Molecular Dynamics, Cluster Analysis, Binding Free-Energy Estimation) allo scopo di analizzare, dal punto di vista strutturale e conformazionale, la proteina HMGB1 che risulta coinvolta nei processi infiammatori. Parallelamente, ho progettato una serie di nonapeptidi capaci di legare HMGB1 e di inibirne l'attività pro-infiammatoria. Inoltre, ho imparato ed applicato una metodica biofisica relativamente nuova chiamata Miscroscale Thermophoresis (MST), che permette la determinazione della costante di dissociazione (K_d), ovvero dell'affinità di legame. Questa metodica è stata applicata in entrambi i progetti per determinare, nel primo caso, la K_d che intercorre tra HMGB1 e la chemochina CXCL12 (interazione proteina-proteina), mentre nel secondo caso, tra il peptide più promettente ed HMGB1, scoprendo il ligando più affine (che abbiamo denominato HBPO8) mai riportato in letteratura per questo target proteico. I risultati di questi lavori hanno portato alla pubblicazione di 2 articoli scientifici (Fassi et al., CSBJ, 2019 ed Sgrignani et al., J.Med.Chem., 2021) e di 1 brevetto intitolato "Peptide inhibitors targeting the CXCL12/HMGB1 interaction and uses thereof" (application number PCT/EP2019/057125).

2) Stagiaire - Institute for Research in Biomedicine (IRB), Bellinzona, Svizzera

Durante la mia esperienza post-laurea come stagiaire presso l'IRB, ho approfondito ulteriormente le mie conoscenze computazionali e della metodica biofisica MST e ho proseguito i progetti precedentemente



iniziati durante la tesi magistrale, sempre nel laboratorio del Dr. Andrea Cavalli. In particolare, ho avuto la possibilità di effettuare numerosi esperimenti MST su HMGB1 allo scopo di completare i progetti iniziati durante la tesi, padroneggiando questa metodica biofisica. Inoltre, sono stato coinvolto in numerose collaborazioni con altri gruppi di ricerca che mi hanno permesso di ampliare ulteriormente il mio bagaglio di conoscenza della chimica computazionale, approfondendo ulteriormente il linguaggio di programmazione Python e l'uso dei programmi di simulazione e di analisi computazionale quali AMBER e GROMACS. Nel dettaglio, ho imparato le tecniche di homology modeling e ho effettuato simulazioni di dinamica molecolare di anticorpi e proteine aventi residui non standard, applicando differenti forze field. I risultati di queste analisi hanno portato alla pubblicazione di un articolo scientifico (Marazza et al., DNA Cell. Biol., 2020). In aggiunta, ho trascorso 2 mesi presso il laboratorio di "Chemokines in immunity" della Prof.ssa Mariagrazia Uguccioni (sempre all'interno dell'IRB) in cui ho imparato a trattare le colture cellulari e ho effettuato numero saggi di migrazione cellulare generando parte dei dati che hanno contribuito alla successiva pubblicazione dell'articolo sul *Journal of Medicinal Chemistry*. Infine, durante questo periodo, la partecipazione ai numerosi seminari, journal clubs e student retreats, organizzati dal centro di ricerca, e la quotidiana interazione con gli altri scienziati ha ulteriormente approfondito la mia conoscenza di base della biologia molecolare e, in particolare, dell'immunologia.

3) Assegno di Ricerca - ICRM-CNR (ora CNR-SCITEC)

L'assegno conferitomi è stato finanziato da Regione Lombardia attraverso il progetto "Network REgionAle per lo sviluppo di metodi Diagnostici in risposta rapida a epidemie emergenti e bioemergenze (READY)". L'attività di ricerca ha riguardato la tematica "Metodi computazionali per il design di sonde diagnostiche", sotto la responsabilità scientifica del Prof. Giorgio Colombo. In particolare, ho applicato diversi metodi computazionali per la predizione e il design di epitopi da strutture 3D proteiche di differenti arbovirus come Chikungunya, Zika e Dengue. L'obiettivo finale del progetto era quello di sviluppare rapid diagnostic test per una tempestiva diagnosi delle patologie tropicali. Parallelamente al progetto principale, sono stato coinvolto in altre collaborazioni in cui ho effettuato studi computazionali per la progettazione di small molecules. In particolare, ho effettuato virtual screening partendo da librerie di milioni di molecole disponibili (ZINC - <https://zinc.docking.org/>), docking e simulazioni di dinamica molecolare. I risultati ottenuti durante l'assegno di ricerca hanno portato alla pubblicazione di 4 articoli scientifici (Bergamaschi, et al., IJMS, 2019; De Benedetti et al., Vaccines, 2021; Cassiano et al., Bioorg.Chem., 2021 e Di Pisa et al., Vaccines, 2022) e 2 lavori sono attualmente in fase di scrittura.

4) Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche - Università degli Studi di Milano

"Computational design of peptides and peptidomimetics as potential therapeutic agents to satisfy pressing medical needs"

Il lavoro svolto durante il periodo di dottorato ha riguardato l'applicazione di avanzati approcci computazionali (structure-based), in combinazione con studi biofisici (MST, SPR e DSF), allo scopo di disegnare e ottimizzare peptidi o peptidomimetici, capaci di interagire con target proteici criticamente coinvolti in diverse condizioni patologiche disabilitanti (infiammatorie, autoimmunitarie o cancro). In questo periodo, oltre ad aver affinato ulteriormente le mie abilità come chimico computazionale, ho imparato ed applicato nuove metodiche come le simulazioni a pH costante, allo scopo di investigare lo stato di protonazione del sito catalitico di PCSK9. L'uso della metadinamica, applicata alle migliori pose di docking generate in modo tale da predire quali fossero le più stabili, riducendo significativamente i tempi di calcolo computazionale. La combinazione di alanine scanning e affinity maturation protocol, utilizzati allo scopo di migliorare la sequenza di un peptide. In questo caso, sono riuscito a migliorare la sequenza del peptide HBPO8 (da me identificato durante il periodo di tesi), capace di legare HMGB1 con una K_d intorno ai 800 nM, ottenendo un peptide migliorato (HBPO8-pep2) avente una K_d intorno ai 15 nM e mostrando un'attività inibitoria della migrazione cellulare 20 volte più bassa rispetto ad HBPO8. L'applicazione dell'intelligenza artificiale (AI) nella chimica computazionale, usando sia metodi di



machine learning che deep learning, che mi ha permesso di identificare dei peptidi in grado di legare e inibire l'attività di WWP1, un target proteico sovra-espresso in vari tipi di tumori quali mammella, fegato e prostata. L'applicazione della meccanica molecolare per studiare il fenomeno dell'atropoisomerismo, in particolare per quanto riguarda l'Elagolix. Oltre alle competenze computazionali, durante il dottorato mi sono focalizzato nell'apprendere nuove metodiche biofisiche volte allo studio del binding tra ligando e proteina. Tra queste, il Differential Scanning Fluorimetry (DSF), che può essere usato come rapido metodo di screening per identificare piccoli ligandi che legano e stabilizzano proteine purificate, e il Surface Plasmon Resonance (SPR), che rappresenta un metodo ampiamente utilizzato per caratterizzare l'affinità di legame (K_d). Durante il dottorato ho pubblicato 7 articoli scientifici (Sgrignani et al., ChemMedChem, 2020; Lammi et al., Nutrients, 2021; Li et al., Nutrients, 2021; Lammi et al., Pharmaceutics, 2022; Fassi et al., IJMS, 2022; Fassi et al., Molecules, 2023; Chiacchio et al., Molecules, 2023) e un articolo è stato accettato per la pubblicazione su *Molecules* in data 28/04/2023.

CONGRESSI, CONVEGNI E SEMINARI

Data	Titolo	Sede
16-17 Novembre 2017	<u>Comunicazione Poster:</u> <i>Computational studies on different redox states of HMGB1 and design of peptides able to block the HMGB1/CXCL12 synergism</i> Fassi EMA, Sgrignani J, D'Agostino G, Cecchinato V, Grazioso G, Uguccioni M, Cavalli A.	<i>5th Computationally Driven Drug Discovery (CDDD) Meeting</i> - Istituto Fondazione di Oncologia Molecolare (IFOM), Milano (Italia)
25 Giugno 2021	<u>Comunicazione Orale:</u> <i>The use of computational approaches behind the discovery of the HMGB1 protein strongest peptide binder</i> Fassi EMA, Sgrignani J, Cecchinato V, Uguccioni M, Cavalli A, Grazioso G.	<i>7th Computationally Driven Drug Discovery (CDDD) Meeting</i> - Virtual Meeting

PUBBLICAZIONI

Articoli su riviste
1) Bergamaschi G*, Fassi EMA* , Romanato A*, D'Annessa I, Odinolfi MT, Brambilla D, Damin F, Chiari M, Gori A, Colombo G, Cretich M, <i>Computational Analysis of Dengue Virus Envelope Protein (E) Reveals an Epitope with Flavivirus Immunodiagnostic Potential in Peptide Microarrays</i> . Int. J. Mol. Sci. 2019 . Vol. 20, p 1921. DOI: 10.3390/ijms20081921. * <u>Co-first authors</u>
2) Fassi EMA , Sgrignani J, D'Agostino G, Cecchinato V, Garofalo M, Grazioso G, Uguccioni M, Cavalli A. <i>Oxidation state dependent conformational changes of HMGB1 regulates the formation of the CXCL12/HMGB1 heterocomplex</i> . Comput. Struct. Biotechnol. J., 2019 . 17:p.886-894. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.06.020.
3) Marazza A, Galli C, Fasana E, Sgrignani J, Burda P, Fassi EMA , Baumgartner M, Cavalli A, Molinari M. <i>Endoplasmic Reticulum and Lysosomal Quality Control of Four Nonsense Mutants of Iduronate 2 Sulfatase Linked to Hunter's Syndrome</i> . DNA Cell Biol. 2020 . 39(2):p.226-234. DOI: 10.1089/dna.2019.5221.



<p>4) Sgrignani J, Fassi EMA, Lammi C, Roda G, Grazioso G. <i>Exploring Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 (PCSK9) Autoproteolysis Process by Molecular Simulations: Hints for Drug Design</i>. ChemMedChem, 2020. DOI: 10.1002/cmdc.202000431.</p>
<p>5) Lammi C, Aiello G, Bollati C, Li J, Bartolomei M, Ranaldi G, Ferruzza S, Fassi EMA, Grazioso G, Sambuy Y, Arnoldi A. <i>Trans-Epithelial Transport, Metabolism, and Biological Activity Assessment of the Multi Target Lupin Peptide LILPKHSDAD (P5) and Its Metabolite LPKHSDAD (P5-Met)</i>. Nutrients, 2021. 13(3):863. DOI: 10.3390/nu13030863.</p>
<p>6) De Benedetti S, Di Pisa F, Fassi EMA, Cretich M, Musicò A, Frigerio R, Mussida A, Bombaci M, Grifantini R, Colombo G, Bolognesi M, Grande R, Zanchetta N, Gismondo MR, Mileto D, Mancon A, Gourlay LJ. <i>Structure, Immunoreactivity, and In Silico Epitope Determination of SmSPI S. mansoni Serpin for Immunodiagnostic Application</i>. Vaccines, 2021. 9(4):322. DOI: 10.3390/vaccines9040322.</p>
<p>7) Li Y, Aiello G, Fassi EMA, Boschin G, Bartolomei M, Bollati C, Roda G, Arnoldi A, Grazioso G, Lammi C. <i>Investigation of Chlorella pyrenoidosa Protein as a Source of Novel Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) and Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) Inhibitory Peptides</i>. Nutrients 2021. 13(5):1624. DOI: 10.3390/nu13051624.</p>
<p>8) Cassiano C, Morretta E, Costantini M, Fassi EMA, Colombo G, Sattin S, Casapullo A. <i>Analysis of Hsp90 allosteric modulators interactome reveals a potential dual action mode involving mitochondrial MDH2</i>. Bioorg Chem. 2021. Oct;115:105258. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105258.</p>
<p>9) Sgrignani J*, Cecchinato V*, Fassi EMA*, D'Agostino G, Garofalo M, Danelon G, Pedotti M, Simonelli L, Varani L, Grazioso G, Ugucioni M, Cavalli A. <i>Systematic Development of Peptide Inhibitors Targeting the CXCL12/HMGB1 Interaction</i>. J Med Chem. 2021. Sep 23;64(18):13439-13450. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00852. * Co-first authors</p>
<p>10) Di Pisa F, De Benedetti S, Fassi EMA, Bombaci M, Grifantini R, Musicò A, Frigerio R, Pontillo A, Rigo C, Abelli S, Grande R, Zanchetta N, Mileto D, Mancon A, Rizzo A, Gori A, Cretich M, Colombo G, Bolognesi M, Gourlay LJ. <i>Elucidating the 3D Structure of a Surface Membrane Antigen from Trypanosoma cruzi as a Serodiagnostic Biomarker of Chagas Disease</i>. Vaccines (Basel). 2022. Jan 3;10(1):71. DOI: 10.3390/vaccines10010071.</p>
<p>11) Lammi C, Fassi EMA, Li J, Bartolomei M, Benigno G, Roda G, Arnoldi A, Grazioso G. <i>Computational Design and Biological Evaluation of Analogs of Lupin Peptide P5 Endowed with Dual PCSK9/HMGCoAR Inhibiting Activity</i>. Pharmaceutics. 2022. Mar 18;14(3):665. DOI: 10.3390/pharmaceutics14030665.</p>
<p>12) Fassi EMA, Garofalo M, Sgrignani J, Dei Cas M, Mori M, Roda G, Cavalli A, Grazioso G. <i>Focused Design of Novel Cyclic Peptides Endowed with GABARAP Inhibiting Activity</i>. Int J Mol Sci. 2022. May 3;23(9):5070. DOI: 10.3390/ijms23095070.</p>
<p>13) Fassi EMA, Manenti M, Citarella A, Dei Cas M, Casati S, Micale N, Schirmeister T, Roda G, Silvani A, Grazioso G. <i>Computational Design, Synthesis, and Biophysical Evaluation of β-Amido Boronic Acids as SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors</i>. Molecules. 2023. Mar 3;28(5):2356. DOI: 10.3390/molecules28052356.</p>
<p>14) Chiacchio MA, Legnani L, Fassi EMA, Roda G, Grazioso G. <i>Development of AMBER Parameters for Molecular Simulations of Selected Boron-Based Covalent Ligands</i>. Molecules. 2023. Mar 22;28(6):2866. DOI: 10.3390/molecules28062866.</p>



Atti di convegni
Contributi Poster:
1) Sgrignani J, Fassi EMA, D'Agostino G, Cecchinato V, Garofalo M, Grazioso G, Uguccione M, Cavalli A. <i>How the oxidation state regulates the CXCL12/HMGB1 heterocomplex</i> . Intervento presentato al convegno Molecular Dynamics Today Meeting: 14-15 Marzo 2019, Bologna (Italia).
2) Villa S, Mori M, Ratti A, Meneghetti F, Roda G, Gelain A, Villa F, Fassi EMA, Forlani F, Grazioso G. <i>Natural compounds targeting E. Coli WRBA as antibiofilm agents: Virtual screening, design and synthesis of analogs, biological evaluation</i> . Intervento presentato al 27° convegno National Meeting on Medicinal Chemistry (NMMC27): 11-14 Settembre 2022, Bari (Italia).
3) Ciceri S, Colombo D, Fassi EMA, Ferraboschi P, Grazioso G, Grisenti P, Meneghetti F. <i>Elagolix analogues as potential new GnRH antagonists</i> . Intervento presentato al 6° convegno BioMeTra Workshop: 20 Settembre 2022, Segrate (Italia).
4) Ciceri S, Colombo D, Fassi EMA, Ferraboschi P, Grazioso G, Grisenti P, Meneghetti F. <i>Elagolix analogues as potential new GnRH antagonists: design, synthesis and characterization</i> . Intervento presentato al convegno Ischia Advanced School of Organic Chemistry (IASOC): 23-26 Settembre 2022, Ischia (Italia).

ALTRE INFORMAZIONI

<p>Il seguente articolo è stato accettato per la pubblicazione su <i>Molecules</i> in data 28/04/2023 (certificato di accettazione in allegato alla domanda):</p> <p>Ciceri S, Colombo D, Fassi EMA, Ferraboschi P, Grazioso G, Grisenti P, Iannone M, Castellano C, Meneghetti F. <i>Elagolix sodium salt and its synthetic intermediates: a spectroscopic, crystallographic, and conformational study</i>.</p>
<p>Il seguente articolo è stato sottoposto a <i>Journal of Medicinal Chemistry</i> ed è attualmente in fase di "accepted with minor revisions":</p> <p>Lammi C, Fassi EMA, Manenti M, Brambilla M, Conti M, Li J, Roda G, Camera M, Silvani A, Grazioso G. <i>Computational Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Diimidazole Analogs Endowed with Dual PCSK9/HMG-CoAR Inhibiting Activity</i>.</p>
<p>Computational chemistry skills:</p> <ul style="list-style-type: none">- <u>Computational Chemistry</u>: Structure Based Virtual Screening, Peptide and Ligand Docking, Homology Modeling, Molecular Dynamics simulations, Metadynamics simulations, Constant-pH Molecular Dynamics simulations, application of Machine Learning and Deep Learning algorithms, Epitope Prediction, Cluster Analysis, Molecular Mechanics, Alanine Scanning and Affinity Maturation Protocols, ADME prediction...- <u>Tools and Software</u>: AMBER, GROMACS, PyMol, Maestro, Glide, Haddock, AutoDock, VMD, MOE, Blast, SwissModel, xmGrace, GNU Plot, GraphPad, ClustalW, Beppe, MacroModel, GIMP...- <u>Biophysical methods</u>: Microscale Thermophoresis (MST), Surface Plasmon Resonance (SPR), Differential Scanning Fluorimetry (DSF).



- **Biological Skills:** trattamento colture cellulari, capacità di lavorare sotto cappa a flusso laminare, saggi di migrazione cellulare, data collection.

- **Personal Skills:**

Ottime competenze relazionali acquisite durante la partecipazione a seminari, journal clubs, student retreats e durante l'interazione quotidiana con altri scienziati durante la mia esperienza lavorativa all'IRB (Bellinzona, Svizzera), all'ICRM-CNR (Milano, Italia) e durante il periodo di dottorato presso l'Università degli Studi di Milano.

Buona capacità di gestire più progetti contemporaneamente grazie alle capacità organizzative e di problem solving che mi caratterizzano.

Ottima capacità di scrivere report e articoli scientifici per la pubblicazione.

Buona padronanza dei programmi per l'elaborazione digitale di suoni e video acquisita come musicista a livello amatoriale.

Ho svolto attività di **tutorato** per il corso "*Laboratorio Analisi dei Medicinali*" nell'ambito del Corso di Studio in "Chimica e Tecnologia Farmaceutiche" presso l'Università degli Studi di Milano (totale: 284 ore).

Ho svolto attività di **tutorato** per il corso "*Chimica e Analisi Fitofarmaceutiche*" nell'ambito del Corso di Studio in "Scienze e Tecnologie Erboristiche" presso l'Università degli Studi di Milano (totale: 8 ore).

Referenze Accademiche:

- Prof. Giorgio Colombo: g.colombo@unipv.it
- Dr. Andrea Cavalli: andrea.cavalli@irb.usi.ch
- Prof.ssa Mariagrazia Uguccioni: mariagrazia.uguccioni@irb.usi.ch

Le dichiarazioni rese nel presente curriculum sono da ritenersi rilasciate ai sensi degli artt. 46 e 47 del DPR n. 445/2000.

Il presente curriculum, non contiene dati sensibili e dati giudiziari di cui all'art. 4, comma 1, lettere d) ed e) del D.Lgs. 30.6.2003 n. 196.

Luogo e data: **MILANO, 29/04/2023**