

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re:	Shan, <i>et al.</i>	Confirmation No.:	9494
Appl No.:	17/624,173	Group Art Unit:	1663
Filed:	December 30, 2021	Examiner:	Santosh Sharma
For:	NOVEL GENETIC LOCI ASSOCIATED WITH RUST RESISTANCE IN SOYBEANS		

Docket No.: S19996 1600US (0227.1)
Customer No.: 26158

Mail Stop Amendment
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

**RULE 37 C.F.R. § 1.132 DECLARATION
of Qingli Liu**

I, Qingli Liu, do hereby declare and say as follows:

1. I am an inventor of U.S. Patent Application 17/624,173 (hereinafter, “the ‘173 Application”). I am skilled in the art of the field of the invention of the above-referenced patent application. I am currently employed by Syngenta Crop Protection AG, an Assignee of the above-referenced patent application.

2. I have been employed by the company currently named Syngenta Crop Protection AG for 15 years. During that time, I have held the following positions: research scientist, senior research scientist, principal scientist, and Syngenta fellow. I am currently working as a Syngenta fellow in Syngenta Seeds Research. Among my other responsibilities, I am responsible for the identification and validation of key crop disease targets. I have several first author publications in the field of plant-microbe interaction describing host resistance and pathogen pathogenicity factors in multiple pathosystems.

3. I have reviewed the pending claims of the '173 application. The claims generally pertain to a novel *RppRC1* gene of SEQ ID NO: 2 found in the rust resistant SX6907 soybean line that confers rust resistance; a protein having at least 90% homology with SEQ ID NO: 1 (the protein sequence encoded by the *RppRC1* gene) or a nucleic acid molecule having at least 93% homology with SEQ ID NO: 2 or encoding a protein having at least 90% homology with SEQ ID NO: 1; DNA constructs, expression cassettes, recombinant vectors, recombinant bacterium, transgenic cell lines, soybean plants and soybean plant cells comprising the nucleotide sequence; and methods of using the same to improve resistance of soybean plants to Asian soybean rust.

4. I have considered the rejection in the Office Action dated April 18, 2024 of claims 47-51, 63, and 73-96 under 35 U.S.C. § 112(a) as allegedly failing to comply with the written description requirement and under 35 U.S.C. § 112(a) because the specification, while being enabling for a protein comprising an amino acid sequence as SEQ ID NO: 1 when expressed in a soybean plant provides increased resistance to Asian soybean rust caused by *Phakospora pachyrhizi*, allegedly does not reasonably provide enablement for a nucleic acid encoding a protein comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 1 and when expressed in any plant provides increased resistance to any rust disease.

5. The RppRC1 protein identified in the '173 application belongs to the nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NLR, also known as NBS-LLR) family of proteins and comprises a nucleotide-binding domain, a leucine-rich repeat domain, and an amino terminal coiled-coil domain. One of ordinary skill in the art would understand how to identify these conserved domains within the RppRC1 protein (disclosed as SEQ ID NO: 1 in the '173 application) by searching a publicly available sequence database, such as the Basic Local Alignment Search Tool available online at blast.ncbi.nlm.nih.gov.

NLR proteins were well-known in the art at the time of the filing of the '173 application as functioning as resistance genes in plants and the conserved domains (e.g., the nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat domain, a toll/interleukin-1 (TIR) or coiled-coil domain in the amino terminus), and the structure of these domains in NBS-LLR proteins were known, as reviewed in McHale et al. (2006) *Genome Biology* 7:212, which is provided herewith.

6. I have considered the rejection in the Office Action dated April 18, 2024 of claims 47-51, 63, and 73-96 of the '173 application as being obvious in light of Chen *et al.* (2015) *Theoretical and Applied Genetics* 128(4):733-743 (hereinafter referred to as "Chen *et al.*"), further in view of Riardan *et al.*, U.S. Patent Publication No. 2018/0103600 (hereinafter referred to as "Riardan *et al.*"), further in view of Pedley *et al.* (2019) *Mol Plant Microbe Interact.* 32(1):120-133 (hereinafter referred to as "Pedley *et al.*"), and further evidenced by NCBI XM_028359655.1. In particular, it is alleged that Chen *et al.* teaches that *Glyma18g51930*, *Glyma18g51950*, and *Glyma18g51960* are good candidate genes for soybean rust resistance in SX6907, and it would have been obvious to someone skilled in the art to identify a nucleic acid molecule having at least 93% identity to SEQ ID NO: 2 encoding a resistance protein of at least 90% identity to SEQ ID NO: 1 from the publicly available germplasm SX6907 by fine mapping the resistant germplasm and cloning a rust resistant soybean gene as allegedly taught by Pedley *et al.*

7. While Chen *et al.* describes the 111.9 kb region between the markers SSR24 and SSR40 and at chromosomal positions 60,620,161 to 60,732,116 of the Williams82 soybean line, which is susceptible to soybean rust, it does not isolate nor describe the corresponding region within the rust resistant SX6907 soybean line. Given that soybean plants are paleopolyploid with various structural differences from accession to accession due to, for example, many gene duplications and rearrangements, one of ordinary skill in the art would understand that the length, sequence, number of genes, and chromosomal positions between the SSR24 and SSR40 markers in the resistant SX6907 soybean line would most likely differ from those in the susceptible soybean line. As a result, the corresponding region in the SX6907 soybean line between the markers SSR24 and SSR40 could have had a different number of genes than the 11 genes that were identified in Williams82 by Chen *et al.* (e.g., fewer than or many more than the 11 identified genes). Chen *et al.* suggests structural variation occurs at this locus by demonstrating that the region surrounding the SSR24 and SSR40 markers are two to four times longer in length in the PI lines 587886 and 587880A that exhibit incomplete resistance as compared to Williams82 (see page 740, left column, second paragraph, and Table 5 of Chen *et*

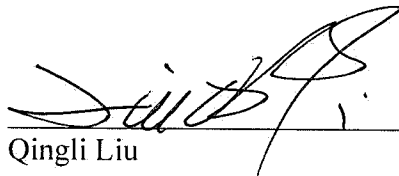
al.). In fact, the corresponding region in the SX6907 soybean line was significantly longer in length and had many more than the 11 putative genes that were identified in Williams82 by Chen *et al.*. Specifically, as shown in Hao *et al.* (2024) *Nature Communications* 15:3310, which describes the discovery of the *RppRC1* gene and on which I am listed as a co-author, there is a 56.77 kb insertion in SX6907, which contained additional genes (including the *RppRC1* gene) and repetitive elements that are not present in the Williams 82 genome assembly (see the first paragraph under Results on page 2 of Hao *et al.*). Further, the *RppRC1* gene set forth as SEQ ID NO: 2 in the '173 application that is responsible for the rust resistance in the resistant SX6907 line was not any of the 11 putative genes identified in Chen *et al.* nor do any of those putative genes found by Chen *et al.* have at least 93% sequence identity to SEQ ID NO: 2 or produce a gene product having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 1. Moreover, none of the putative proteins identified by Chen *et al.* between the markers SSR24 and SSR40 in the susceptible Williams82 soybean line are capable of conferring resistance to rust.

8. Given the inability to clone any rust resistance genes from the soybean genome at the time of the filing of the '173 application, one of ordinary skill in the art would not have had a reasonable expectation of success in cloning a gene from soybean capable of conferring rust resistance, even if the locus had been mapped. In fact, as is stated in Hao *et al.* (see first full paragraph on page 2), although there were eight rust resistance loci identified and mapped on the soybean genome at the time of the filing of the '173 application, no gene had been cloned from the soybean genome that can confer rust resistance.

9. The *RppRC1* gene set forth as SEQ ID NO: 2 in the '173 application has a particularly advantageous property in that it provides resistance against **all** tested rust strains, whereas the *CcRpp1* gene that is often used in the field to provide rust resistance, does not. Furthermore, we have found that the *RppRC1* protein of SEQ ID NO: 1 mediates resistance to rust via a different mode of action than the *Rpp1* protein in view of our assays demonstrating that the *RppRC1* protein interacts with a different set of effector proteins than those recognized by the *Rpp1* protein. The identification of the *RppRC1* gene and its encoded protein is a significant agricultural breakthrough in controlling rust strains, particularly those that are resistant to the

Rpp1 protein, and this meets an unmet need in the field of soybean farming for an alternative gene to *CcRpp1* that can be introduced into a plant to confer rust resistance.

10. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.



Qingli Liu

9/30/2024
Date

PATENTE

EN LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

Re: Shan, et al.

N.º de confirmación: 9494

N.º de solicitud: 17/624,173

Unidad de Arte del Grupo: 1663

Presentada: 30 de diciembre de 2021

Examinador: Santosh Sharma

Para: NUEVOS LOCI GENÉTICOS ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A LA ROYA EN LA SOJA

N.º de expediente: S19996 1600US (0227.1)

N.º de cliente: 26158

Comisionado de Enmiendas de Suscripción Postal

Apartado de Correos 1450

Alexandria, VA 22313-1450

REGLA 37 C.F.R. § 1.132 DECLARACIÓN

de Qingli Liu

Yo, Qingli Liu, declaro lo siguiente:

1. Soy inventor de la solicitud de patente estadounidense 17/624,173 (en adelante, "la Solicitud 173"). Poseo conocimientos técnicos en el campo de la invención objeto de la solicitud de patente antes mencionada. Actualmente trabajo para Syngenta Crop Protection AG, cesionaria de la solicitud de patente antes mencionada.
2. He trabajado para la empresa actualmente denominada Syngenta Crop Protection AG durante 15 años. Durante este tiempo, he desempeñado los siguientes cargos: investigador científico, investigador científico sénior, científico principal y becario de Syngenta. Actualmente trabajo como becario de Syngenta en Syngenta Seeds Research. Entre mis responsabilidades, me encargo de la identificación y validación de objetivos clave para el control de enfermedades en cultivos. Cuento con varias publicaciones como primer autor en el campo de la interacción planta-microorganismo, donde describo la resistencia del huésped y los factores de patogenicidad de los patógenos en diversos sistemas patógenos.
3. He revisado las reivindicaciones pendientes de la solicitud '173. Dichas reivindicaciones se refieren, en general, a un nuevo gen RppRCL con SEQ ID NO: 2, presente en la línea de soja SX6907 resistente a la roya, que confiere resistencia a esta enfermedad; una proteína con al menos un 90

% de homología con SEQ ID NO: 1 (la secuencia proteica codificada por el gen RppRC1) o una molécula de ácido nucleico con al menos un 93 % de homología con el SEQ ID NO: 2 o que codifica una proteína con al menos un 90 % de homología con el SEQ ID NO: 1; construcciones de ADN, casetes de expresión, vectores recombinantes, bacterias recombinantes, líneas celulares transgénicas, plantas de soja y células de plantas de soja que comprenden la secuencia de nucleótidos; y métodos para su uso con el fin de mejorar la resistencia de las plantas de soja a la roya asiática.

4. He examinado el rechazo, en la Notificación Oficial de fecha 18 de abril de 2024, de las reivindicaciones 47-51, 63 y 73-96, conforme al artículo 112(a) del Título 35 del Código de los Estados Unidos, por presuntamente no cumplir con el requisito de descripción escrita, y, conforme al artículo 112(a) del Título 35 del Código de los Estados Unidos, porque la Descripción, si bien permite capacita para realizar una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos como SEQ ID NO: 1 y que, al expresarse en una planta de soja, proporciona mayor resistencia a la roya asiática de la soja causada por *Phakospora pachyrhiz-i*, presuntamente no permite la realización de un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1 y que, al expresarse en cualquier planta, proporciona mayor resistencia a cualquier enfermedad de la roya.

5. La proteína RppRC1 identificada en la solicitud '173 pertenece a la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina y sitio de unión a nucleótidos (NLR, también conocidas como NBS-LLR) y comprende un dominio de unión a nucleótidos, un dominio de repetición rica en leucina y un dominio de hélice enrollada en el extremo amino terminal. Un experto en la materia comprendería cómo identificar estos dominios conservados dentro de la proteína RppRC1 (identificada como SEQ ID NO: 1 en la solicitud '173) mediante la búsqueda en una base de datos de secuencias de acceso público, como la herramienta de búsqueda de alineación local básica disponible en línea en blast.ncbi.nlm.nih.gov.

Las proteínas NLR eran bien conocidas en el ámbito científico en el momento de la presentación de la solicitud '173 por funcionar como genes de resistencia en plantas y se conocían los dominios conservados (por ejemplo, el dominio de unión a nucleótidos, el dominio de repetición rico en leucina, un dominio de toll/interleucina-1 (TIR) o de hélice enrollada en el extremo amino), y la estructura de estos dominios en las proteínas NBS-LLR, como se revisa en McHale et al. (2006) *Genome Biology* 7:212, que se adjunta aquí.

6. He considerado que el rechazo en la Notificación de la Oficina de Patentes de fecha 18 de abril de 2024 de las reivindicaciones 47-51, 63 y 73-96 de la solicitud '173 por ser obvio a la luz de Chen et al. (2015) *Theoretical and Applied Genetics* 128(4):733-743 (en adelante, "Chen et al."), además en vista de Riardan et al., *Publicación de Patente de EE. UU. n.º 2018/0103600* (en adelante, "Riardan et al."), además en vista de Pedley et al. (2019) *Xloli Platit Microbe Interact.* 32(1):120-133 (en adelante, "Pedley et al."), y además evidenciado por NCBI XM 028359655.1. En particular,

se alega que Chen et al. enseña que Glymal8g5l930, Glymal8g5l950 y Glymal8g5l960 son buenos genes candidatos para la resistencia a la roya de la soja en SX6907, y habría sido obvio para alguien experto en la materia identificar una molécula de ácido nucleico con al menos un 93 % de identidad con SEQ ID NO: 2 que codifica una proteína de resistencia con al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 1 del germoplasma SX6907 disponible públicamente, mediante el mapeo fino del germoplasma resistente y la clonación de un gen de soja resistente a la roya, como supuestamente enseñaron Pedley et al.

7. Aunque que Chen et al. describe la región de 111,9 kb entre los marcadores SSR24 y SSR40 y en las posiciones cromosómicas 60.620.161 a 60.732.116 de la línea de soja Williams82, que es susceptible a la roya de la soja, no aísla ni describe la región correspondiente dentro de la línea de soja SX6907 resistente a la roya. Dado que las plantas de soja son paleopoliploides con diversas diferencias estructurales de una accesión a otra debido, por ejemplo, a muchas duplicaciones y reordenamientos de genes, un experto en la materia entendería que la longitud, la secuencia, el número de genes y las posiciones cromosómicas entre los marcadores SSR24 y SSR40 en la línea de soja resistente SX6907 probablemente diferirían de las de la línea de soja susceptible. Como resultado, la región correspondiente en la línea de soja SX6907 entre los marcadores SSR24 y SSR40 podría haber tenido un número diferente de genes que los 11 genes que fueron identificados en Williams82 por Chen et al. (por ejemplo, menos que o muchos más que los 11 genes identificados). Chen et al. sugiere que se produce una variación estructural en este locus al demostrar que la región que rodea a los marcadores SSR24 y SSR40 es de dos a cuatro veces más larga en longitud en las líneas PI 587886 y 587880A que exhiben resistencia incompleta en comparación con Williams82 (ver página 740, columna izquierda, segundo párrafo y Tabla 5 de Chen et al.). De hecho, la región correspondiente en la línea de soja SX6907 era significativamente más larga y tenía muchos más que los 11 genes putativos que fueron identificados en Williams82 por Chen et al. Específicamente, como se muestra en Hao et al. (2024) Nature Communications 15:3310, que describe el descubrimiento del gen RppRC 1 y en el que figuro como coautor, hay una inserción de 56,77 kb en SX6907, que contenía genes adicionales (incluido el gen RppRC1) y elementos repetitivos que no están presentes en el ensamblaje del genoma Williams 82 (véase el primer párrafo bajo Resultados en la página 2 de Hao et al.). Además, el gen RppRC1 establecido como SEQ ID NO: 2 en la aplicación 173 que es responsable de la resistencia a la roya en la línea resistente SX6907 no era ninguno de los 11 genes putativos identificados en Chen et al. ni ninguno de esos genes putativos encontrados por Chen et al. tienen al menos un 93% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 o producen un producto génico que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. Además, ninguna de las proteínas putativas identificadas por Chen et al. entre los marcadores SS R24 y SSR40 en la línea de soja susceptible Williams82 es capaz de conferir resistencia a la roya.

8. Dada la imposibilidad de clonar genes de resistencia a la roya del genoma de la soja al momento de presentar la solicitud '173, un experto en la materia no habría tenido una expectativa razonable de éxito al clonar un gen de la soja capaz de conferir resistencia a la roya, incluso si el locus

hubiera sido mapeado. De hecho, como se indica en Hao et al. (véase el primer párrafo de la página 2), si bien se identificaron y mapearon ocho loci de resistencia a la roya en el genoma de la soja al momento de presentar la solicitud '173, no se había clonado ningún gen del genoma de la soja capaz de conferir resistencia a la roya.

9. El gen RppRC1, identificado como SEQ ID NO: 2 en la solicitud '173, posee una propiedad particularmente ventajosa, ya que proporciona resistencia contra **todas** las cepas de roya analizadas, mientras que el gen CcRpp1, que se utiliza frecuentemente en el campo para proporcionar resistencia a la roya, no lo hace. Además, hemos descubierto que la proteína RppRC1 de SEQ ID NO: 1 media la resistencia a la roya mediante un mecanismo de acción diferente al de la proteína Rpp1, dado que nuestros ensayos demuestran que la proteína RppRC1 interactúa con un conjunto distinto de proteínas efectoras que las reconocidas por la proteína Rpp1. La identificación del gen RppRC1 y la proteína que codifica representa un avance agrícola significativo en el control de las cepas de roya, en particular las resistentes a la proteína Rpp1, y satisface una necesidad insatisfecha en el cultivo de la soja: un gen alternativo a CcRpp1 que pueda introducirse en la planta para conferirle resistencia a la roya.

10. Declaro que todas las afirmaciones aquí contenidas, según mi leal saber y entender, son verdaderas y que todas las afirmaciones basadas en información y convicción se consideran verdaderas. Asimismo, se declara que estas declaraciones se realizaron con pleno conocimiento de que las declaraciones falsas intencionadas y similares son punibles con multa o prisión, o ambas, conforme al artículo 1001 del título 18 del Código de los Estados Unidos, y que dichas declaraciones falsas intencionadas pueden poner en peligro la validez de la solicitud o de cualquier patente concedida en virtud de la misma.

Firma ilegible
Qingli Liu Fecha

9/30/2024
Fecha