

## Supplementary Materials: Third Generation Antivenomics: Pushing the Limits of the in Vitro Preclinical Assessment of Antivenoms

Davinia Pla, Yania Rodríguez and Juan J. Calvete

Table S1. Total and concentration-dependent immunoretained (RET) *B. arietans* (Ghana) venom proteins by EchiTAB-Plus-ICP® antivenom affinity column.

RP-HPLC fraction		<i>Bitis arietans</i> (Ghana) total venom proteins (g)								Toxin class	
		100	200	300	500	700	900	1200	1500		
2	g TOTAL	2,1	4,2	6,3	10,4	14,6	18,8	25,0	31,3	DISI	
	g RET	0,6	0,1	0,4	2,2	2,4	2,7 (14,3%)	1,8	1,9		
3	g TOTAL	9,6	19,3	28,9	48,2	67,5	86,8	115,7	144,6		
	g RET	6,3	5,3	6,3	3,0	5,7	10,9 (12,6%)	6,3	5,8		
4	g TOTAL	2,9	5,7	8,6	14,3	20,0	25,7	34,3	42,9		
	g RET	2,0	2,4	2,9	2,3	3,2	6,1 (23,7%)	4,3	1,8		
<b>Σ</b>		<b>8,9</b>	<b>7,8</b>	<b>9,6</b>	<b>7,5</b>	<b>11,3</b>	<b>19,7</b>	<b>12,4</b>	<b>9,5</b>		
8	g TOTAL	3,4	6,8	10,2	16,9	23,7	30,5	40,6	50,8		KUN
	g RET	1,1	1,5	2,4	1,4	3,4	4,1 (13,5)	2,7	1,8		
<b>Σ</b>		<b>1,1</b>	<b>1,5</b>	<b>2,4</b>	<b>1,4</b>	<b>3,4</b>	<b>4,1</b>	<b>2,7</b>	<b>1,8</b>		
10	g TOTAL	0,5	1,0	1,5	2,5	3,5	4,5	6,0	7,5	PLA <sub>2</sub>	
	g RET	0,5	0,8	1,0	1,4	2,2	2,9 (66,6%)	2,5	3,4		
13	g TOTAL	3,5	7,0	10,6	17,6	24,7	31,7	42,3	52,9		
	g RET	3,5	6,5	10,3	14,6	15,7	17,5 (55%)	16,4	17,5		
<b>Σ</b>		<b>3,5</b>	<b>6,5</b>	<b>10,3</b>	<b>14,6</b>	<b>15,7</b>	<b>17,5</b>	<b>16,4</b>	<b>17,5</b>		
14	g TOTAL	2,8	5,6	8,3	13,9	19,5	25,0	33,4	41,7		Cystatin
	g RET	2,8	5,6	8,3	12,1	12,9	13,3 (53%)	10,1	11,5		
<b>Σ</b>		<b>2,8</b>	<b>5,6</b>	<b>8,3</b>	<b>12,1</b>	<b>12,9</b>	<b>13,3</b>	<b>10,1</b>	<b>11,5</b>		
15	g TOTAL	12,3	24,6	36,9	61,5	86,1	110,7	147,6	184,6	SerPro	
	g RET	11,5	23,6	34,5	39,6 (64,4%)	38,7	38,6	37,5	11,9		

16	g TOTAL	2,0	4,0	6,0	10,0	14,1	18,1	24,1	30,1	CTL
	g RET	2,0	4,0	6,0	9,0	9,4	10,0 (55.2%)	9,6	7,5	
18	g TOTAL	6,0	11,9	17,9	29,8	41,7	53,6	71,4	89,3	
	g RET	6,0	11,9	17,9	25,9	29,5	31,2 (59%)	29,0	20,4	
<b>Σ</b>		<b>19,5</b>	<b>39,5</b>	<b>58,4</b>	<b>74,5</b>	<b>77,6</b>	<b>79,8</b>	<b>76,1</b>	<b>39,8</b>	
20	g TOTAL	4,3	8,7	13,0	21,7	30,4	39,1	52,2	65,2	
	g RET	4,3	8,5	12,9	20,3	27,8	32,0	34,6 (66.3)	31,0	
22	g TOTAL	13,5	27,0	40,5	67,5	94,5	121,5	161,9	202,4	
	g RET	13,4	26,9	40,1	61,3	64,3	70,6 (58.1%)	66,3	43,8	
25	g TOTAL	1,4	2,8	4,2	7,0	9,8	12,6	16,8	21,0	
	g RET	1,4	2,8	4,0	6,2	8,6	10,7	13,1 (78%)	13,0	
<b>Σ</b>		<b>19,1</b>	<b>38,2</b>	<b>57,0</b>	<b>86,8</b>	<b>100,7</b>	<b>113,3</b>	<b>114,0</b>	<b>87,8</b>	
26	g TOTAL	26,8	53,5	80,3	133,8	187,3	240,8	321,1	401,4	PI-SVMP
	g RET	26,3	48,9	55,5 (69.1%)	42,8	37,4	34,5	24,9	14,1	
<b>Σ</b>		<b>26,3</b>	<b>48,9</b>	<b>55,5</b>	<b>42,8</b>	<b>37,4</b>	<b>34,5</b>	<b>24,9</b>	<b>14,1</b>	
28	g TOTAL	1,8	3,5	5,3	8,8	12,3	15,8	21,1	26,3	PIII-SVMP
	g RET	1,8	3,5	5,3	8,8	12,3	15,8	18,2 (86.3%)	18,2	
29	g TOTAL	1,6	3,2	4,8	7,9	11,1	14,3	19,0	23,8	
	g RET	1,4	3,2	4,8	7,9	11,1	14,3	17,7 (93.2%)	16,8	
<b>Σ</b>		<b>3,2</b>	<b>6,7</b>	<b>10,1</b>	<b>16,7</b>	<b>23,4</b>	<b>30,1</b>	<b>35,9</b>	<b>35,0</b>	

Maximal binding capacity: 348,1 g venom proteins retained by 8 mg EchiTab-Plus-ICP (= 43,5 mg venom proteins/g IgG)

Maximal binding for each RP-HPLC fraction is highlighted in yellow background. Green background, amount (in g) of toxin family proteins immunoretained in the affinity columns.

**Table S2.** Total and immunoretained (RET) *N. melanoleuca* (Ghana) venom proteins by EchiTAB-Plus-ICP® antivenom affinity column.

		<i>Naja melanoleuca</i> (Ghana) total venom proteins g)							
RP-HPLC fraction		100	200	300	500	700	900	1200	Toxin class
1	g TOTAL	0,3	0,7	1,0	1,7	2,3	3,0	4,0	
	g RET	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
3	g TOTAL	12,6	25,3	37,9	63,2	88,5	113,8	151,8	
	g RET	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	
4	g TOTAL	3,3	6,7	10,0	16,6	23,3	29,9	39,9	
	g RET	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
6	g TOTAL	0,6	1,2	1,9	3,1	4,3	5,6	7,4	
	g RET	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
7	g TOTAL	2,4	4,8	7,2	12,0	16,8	21,6	28,8	
	g RET	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	
8	g TOTAL	10,8	21,6	32,3	53,9	75,4	97,0	129,3	3FTx (8-14 min)
	g RET	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	
9	g TOTAL	6,6	13,2	19,8	33,0	46,3	59,5	79,3	
	g RET	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	
10	g TOTAL	0,5	1,0	1,5	2,5	3,5	4,5	6,0	
	g RET	NRQ	NRQ	NRQ	NRQ	NRQ	NRQ	NRQ	
11	g TOTAL	1,0	2,1	3,1	5,1	7,2	9,2	12,3	
	g RET	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	
12	g TOTAL	1,1	2,2	3,3	5,5	7,7	9,9	13,2	
	g RET	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	
13	g TOTAL	0,7	1,3	2,0	3,4	4,7	6,0	8,1	
	g RET	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	
	<b>Σ</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	
15	g TOTAL	0,4	0,9	1,3	2,2	3,1	4,0	5,3	
	g RET	0,4	0,8	1,1	1,8	2,2	2,5 (62,5%)	2,3	PLA <sub>2</sub>
16	g TOTAL	10,3	20,6	30,9	51,5	72,2	92,8	123,7	

	g RET	9,8	10,8	11,5 (37,2%)	10,7	10,4	8,0	1,0	
17	g TOTAL	0,2	0,4	0,6	0,9	1,3	1,7	2,2	
	g RET	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7 (53,8%)	0,5	0,6	
18	g TOTAL	2,3	4,7	7,0	11,7	16,4	21,0	28,0	
	g RET	2,3	4,2	5,3	5,0	5,0	5,8 (27,6%)	5,5	
20	g TOTAL	4,9	9,7	14,6	24,3	34,0	43,7	58,2	
	g RET	4,6	6,6	7,2 (49,3%)	5,8	5,7	6,1	6,1	
21	g TOTAL	4,4	8,7	13,1	21,8	30,5	39,2	52,3	
	g RET	3,3	4,9	7,8	4,1	11,5	20,1	24,2 (45,9%)	
	<b>Σ</b>	<b>20,9</b>	<b>27,6</b>	<b>33,3</b>	<b>27,9</b>	<b>35,5</b>	<b>43,0</b>	<b>41,2</b>	
22	g TOTAL	12,0	24,0	36,1	60,1	84,2	108,2	144,3	
	g RET	9,8	12,0	12,6	12,8	24 (28,5%)	14,3	1,2	
23	g TOTAL	1,5	3,1	4,6	7,7	10,8	13,9	18,6	3FTx (18-22 min)
	g RET	1,5	2,2	2,8	2,5	2,8	3,7 (26,6%)	2,7	
24	g TOTAL	0,2	0,4	0,6	1,1	1,5	1,9	2,6	
	g RET	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	URQ*	
	<b>Σ</b>	<b>11,5</b>	<b>14,6</b>	<b>16,0</b>	<b>16,4</b>	<b>28,3</b>	<b>19,9</b>	<b>6,2</b>	
27	g TOTAL	0,6	1,3	1,9	3,2	4,5	5,8	7,8	Vespryn
	g RET	-0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,8 (13,8%)	0,0	
	<b>Σ</b>	<b>-0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,8</b>	<b>0,0</b>	
29	g TOTAL	3,9	7,8	11,6	19,4	27,2	34,9	46,6	
	g RET	3,5	5,3	6,5 (56%)	4,8	5,1	5,3	0,3	
30	g TOTAL	0,9	1,8	2,7	4,6	6,4	8,2	11,0	CRISP
	g RET	0,7	0,7	0,9 (33,3%)	0,5	0,9	0,7	0,8	
32	g TOTAL	4,7	9,3	14,0	23,3	32,6	41,9	55,9	
	g RET	3,4	5,5	7,2	8,2	10,1	10,7 (25,5%)	5,7	
	<b>Σ</b>	<b>7,6</b>	<b>11,5</b>	<b>14,6</b>	<b>13,5</b>	<b>16,1</b>	<b>16,7</b>	<b>6,8</b>	
34	g TOTAL	1,1	2,1	3,2	5,3	7,5	9,6	12,8	PIII-SVMP
	g RET	1,1	2,1	3,2	3,6 (67,9%)	2,8	2,4	3,1	
35	g TOTAL	6,0	12,0	18,0	30,0	42,0	54,0	72,0	

	g RET	6,0	10,5	14,0	14,8	15,8	16,5 (30,6%)	7,3	
	<b>Σ</b>	<b>7,6</b>	<b>13,5</b>	<b>18,6</b>	<b>19,7</b>	<b>19,5</b>	<b>20,2</b>	<b>12,0</b>	
36	g TOTAL	0,3	0,6	0,9	1,5	2,1	2,8	2,7	PDE
	g RET	0,3	0,6	0,9	1,5	2,1	2,8 (100%)	2,7	
	<b>Σ</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,9</b>	<b>1,5</b>	<b>2,1</b>	<b>2,8</b>	<b>2,7</b>	
37	g TOTAL	1,6	3,2	4,7	7,9	11,0	14,2	18,9	PDE
	g RET	1,2	2,7	3,5	6,7	7,9	8,7 (61,2%)	6,1	
38	g TOTAL	0,6	1,1	1,7	2,8	3,9	5,0	6,7	LAO
	g RET	0,6	1,1	1,5	2,4	2,8 (72%)	2,6	2,5	
39	g TOTAL	3,6	7,3	10,9	18,2	25,5	32,8	43,8	LAO
	g RET	3,5	7,1	10,7	16,9	20,7	23,8 (72,5%)	23,8	
	<b>Σ</b>	<b>5,3</b>	<b>10,9</b>	<b>15,7</b>	<b>26,0</b>	<b>31,4</b>	<b>35,1</b>	<b>32,4</b>	

Maximal binding capacity: 156,5 g venom proteins retained by 8 mg EchiTAB-Plus-ICP (= 19,6 mg venom proteins/g IgG)

Maximal binding for each RP-HPLC fraction is highlighted in yellow background. Green background, amount (in g) of toxin family proteins immunoretained in the affinity columns. \* URQ, Unreliable quantification; indistinguishable from non-specific binding background.