

**RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE**  
**Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte**  
Organiskās ķīmijas tehnoloģijas institūts  
Bioloģiski aktīvo savienojumu ķīmijas tehnoloģijas katedra

**RIGA TECHNICAL UNIVERSITY**  
**Faculty of Material Science and Applied Chemistry**  
Institute of Tehnology of Organic Chemistry  
Department of Chemical Tehnology of Biologically Active  
Compounds

**Zanda Bluķe**

Doktora studiju programmas “Ķīmija” doktorante  
Student of doctoral studies program “Chemistry”

**POTENCIĀLU NMDA RECEPTORU LIGANDU – 1,1-  
DIOKSO-2H-BENZO[e][1,2]TIAZĪN-3-KARBONSKĀBJU  
SINTĒZE**

Promocijas darba kopsavilkums

**SYNTHESIS OF 1,1-DIOXO-2H-BENZO[e][1,2]THIAZINE-3-  
CARBOXYLIC ACID AS POTENCIAL LIGANDS FOR NMDA  
RECEPTORS**

Summary of Doctoral Thesis

Zinātniskais vadītājs (supervisor)  
*Dr. chem.*, vad. pētnieks  
**V. KAUSS**

**Rīga 2015**

Bluķe Z. Potenciālu NMDA receptoru ligandu –  
1,1-diokso-2*H*-benzo[e][1,2]tiazīn-3-karbonskābju  
sintēze.

Promocijas darba kopsavilkums.-R.:RTU  
Izdevniecība, 2015.- 48.lpp.

Iespiests saskaņā ar Promocijas padomes RTU  
P-01 2015. gada 30. aprīļa lēmumu, protokola  
Nr.17.

**PROMOCIJAS DARBS  
IZVIRZĪTS RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ  
ĶĪMIJAS ZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI**

Promocijas darbs ķīmijas zinātņu doktora grāda iegūšanai tiek aizstāvēts 2015. gada 25. jūnijā, plkst. 14:00 Rīgas Tehniskās Universitātes Materiālzinātnes un Lietišķās ķīmijas fakultātē, Rīgā, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

**OFICIĀLIE RECENZENTI**

Prof., *Dr. chem.* Māris TURKS  
Rīgas Tehniskā Universitāte

Vad. pētnieks, *Dr. Chem.* Mārtiņš KATKEVIČS  
Latvijas Organiskās Sintēzes institūts

Vad. pētnieks, *Dr. Chem.* Pēteris TRAPENCIERIS  
Rīgas Stradiņa Universitāte, Latvijas Organiskās Sintēzes institūts

**APSTIPRINĀJUMS**

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi doto promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā Universitātē ķīmijas zinātņu doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs nav iesniegts nevienā citā universitātē zinātniskā grāda iegūšanai.

Zanda Bluķe .....(Paraksts)

Datums: .....

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, satur ievadu, 3 nodaļas, secinājumus, literatūras sarakstu, 47 attēlus, 39 tabulas, 2 pielikumus, kopā 165 lappuses. Literatūras sarakstā ir 80 nosaukumi.

## SATURS

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....                                                                                                           | 5  |
| Tēmas aktualitāte.....                                                                                                                                 | 5  |
| Pētījuma mērķis un uzdevumi.....                                                                                                                       | 5  |
| Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti.....                                                                                                         | 6  |
| Darba struktūra un apjoms.....                                                                                                                         | 6  |
| Darba aprobācija un publikācijas.....                                                                                                                  | 7  |
| PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI.....                                                                                                               | 8  |
| 1. 1,1-Diokso-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju sintēze.....                                                                                  | 9  |
| 2. 1,1-Diokso-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju sintēze.....                                                                      | 12 |
| 3. Enantioselektīva 1,1-diokso-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju sintēze.. ....                                                   | 13 |
| 4. 4-Hidroksi-1,1-diokso-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazīnu izmantošana 1,1-diokso-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju sintēzei.....      | 17 |
| 5. 1,1-Diokso-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju <i>in vitro</i> GlyB aktivitāte.....                                              | 21 |
| SECINĀJUMI.....                                                                                                                                        | 25 |
| GENERAL OVERWIEV OF THE THESIS.....                                                                                                                    | 27 |
| Topicality of the theme.....                                                                                                                           | 27 |
| Aims and objectives.....                                                                                                                               | 27 |
| Scientific novelty and main results.....                                                                                                               | 28 |
| Structure and volume of main thesis.....                                                                                                               | 28 |
| Publications and approbation of the thesis.....                                                                                                        | 29 |
| MAIN RESULTS OF THE THESIS.....                                                                                                                        | 30 |
| 1. Synthesis of 2 <i>H</i> -1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides.....                                                                      | 31 |
| 2. Synthesis of 3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides.....                                                          | 34 |
| 3. Enantioselective synthesis of 3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides.....                                         | 35 |
| 4. Application of 4-hydroxy-2 <i>H</i> -1,2-benzothiazine 1,1-dioxides in the synthesis of 3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2-benzothiazine 1,1-dioxides..... | 39 |
| 5. GlyB <i>in vitro</i> activity of 1,1-dioxo-2 <i>H</i> -1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids.....                                                    | 43 |
| CONCLUSIONS.....                                                                                                                                       | 47 |

## PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

### Tēmas aktualitāte

Glutamāts ir galvenais zīdītāju CNS neiromediators. Nervu šūnu signālu pārnēsē uztveres un atmiņas veidošanas procesos svarīga loma ir vienam no glutamāta receptoriem – *N*-metil-*D*-aspartāta (NMDA) receptoram. Receptora pārlieku stimulācija ir iesaistīta neironu nāvē, kas iespējama gan hipoksijas apstākļos, gan neurodeģeneratīvu traucējumu gadījumā, kā Alcheimera un Hantingtona slimības. NMDA receptors ir organizēts kā jonu kanāls, kuru aktivē endogēnais ligands glutamāts koagonista – glicīna klātbūtnē, kurš nepieciešams jonu kanāla aktivitātei. Tāpēc glicīna saistīšanās vieta (GlyB) ir uzskatāma par svarīgu farmakoloģisko mērķi un ir atklāti vairāki augstas afinitātes GlyB antagonisti. NMDA receptora glicīna saistīšanās vietas liganda farmokoforais modelis iekļauj polāru skābes funkciju, kas ir svarīgs elements mijiedarbībai ar receptora arginīna molekulas bāzisko guanidīna fragmentu. Taču šādas polāras grupas samazina savienojumu spēju šķērsot hematoencefalisko barjeru. Tā bija galvenā problēma mēģinot izstrādāt CNS terapeitiskos līdzekļus, kas darbotos kā NMDA receptora GlyB antagonisti. Pēdējos 10 gados lielāka uzmanība pievērsta perifērajiem NMDA receptoriem. Glutamāta receptoru regulācijai ir svarīga loma sāpju procesos, kas saistīti ar perifēro nervu iekaisumu. Perifēras darbības GlyB antagonistu izstrādāšana varētu novest pie jauna tipa preperātiem neiropatisko sāpju ārstēšanai.

### Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir izstrādāt jaunus NMDA receptora GlyB antagonistus. Viens no iespējamajiem dizaina virzieniem ir netipiska GlyB antagonista - 1,1-dioksobenzotiadiazīna RPR-104632 struktūras modificēšana, aizstājot tradicionālajam farmakoforu modelim atbilstošo 4-NH grupu ar nepolāru  $sp^2$  un  $sp^3$  CH, iegūstot potenciālus NMDA receptora antagonistus: 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābi un 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābi. Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- 1) Izstrādāt 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju un to 3,4-dihidroanalogu sintēzes paņēmienus un izanalizēt struktūras-aktivitātes sakarības iegūto savienojumu rindā.
- 2) Izstrādāt 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju enantioselektīvas sintēzes metodi.

- 3) Ņemot vērā to, ka visplašāk pētītie un vieglāk iegūstamie ir 4-hidroksi-1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīni, svarīgs uzdevums ir noskaidrot vai ir iespējams izstrādāt minēto benzotiazīnu 4-hidroksi grupas eliminēšanas un/vai reducēšanas metodes 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju un to 3,4-dihidroanalogu iegūšanai.

### **Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti**

GlyB antagonistu  $sp^2$  CH koncepcijas efektivitāte jaunu NMDA receptoru ligandu iegūšanai bija parādīta naftalīnkarbonskābju rindā. Tomēr šīm struktūrām raksturīga zema selektivitāte un augstai aktivitātei nepieciešama vēl viena polāra skābes grupa. Sulfonamīda fragmenta iekļaušana aromātiskajā struktūrā ļauj risināt minētās problēmas. Diemžēl tikai viena no 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābēm uzrādīja nelielu GlyB afinitāti. Savukārt otra koncepcija, kas balstījās uz  $sp^3$  CH izmantošanu, bija veiksmīga un vairākas sintezētās 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes uzrādīja vērā ņemamu afinitāti. Tas, ka tradicionālajos GlyB antagonistu farmakoforu modeļos postulēto ūdeņraža saites donoru varētu aizstāt ar  $sp^3$  CH, ir pārsteidzoša novitāte. Šī pieeja paver iespēju daudz plašākam potenciāli selektīvu NMDA receptora ligandu dizainam. Darbā nodemonstrēta GlyB ligandu enantiodiskriminēšana 3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju rindā – (S)-konfigurācijas savienojuma saistība ar receptoru bija 10 reizes spēcīgāka kā (R)-izomēram.

### **Darba struktūra un apjoms**

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, satur literatūras apskatu, rezultātu izvērtējumu, eksperimentālo daļu un pielikumus. Literatūras apskatā apkopota pēdējos 10 gados publicētā informācija par GlyB antagonistiem, jo šajā laikā parādījās idejas par to perifēro pielietojumu. Tāpat apkopota informācija par 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju un to 3,4-dihidroanalogu sintēzi. Rezultātu izvērtējumā ir aprakstīta 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju un to 3,4-dihidroanalogu sintēze un salīdzināta to aktivitāte. Izstrādāta 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju asimetriskā sintēze, salīdzināta enantiomēru aktivitāte. Izvērtēta 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju un to 3,4-dihidroanalogu iegūšana - izmantojot 4-hidroksi-1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīnu reducēšanas iespējas. Eksperimentālajā daļā doti sintēžu apraksti un savienojumu spektroskopiskais raksturojums.

## Darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba rezultāti ziņoti 2 starptautiskās konferencēs kā stenda referāti, publicēts viens zinātniskais raksts un viens pieņemts publicēšanai.

### Stenda referāti:

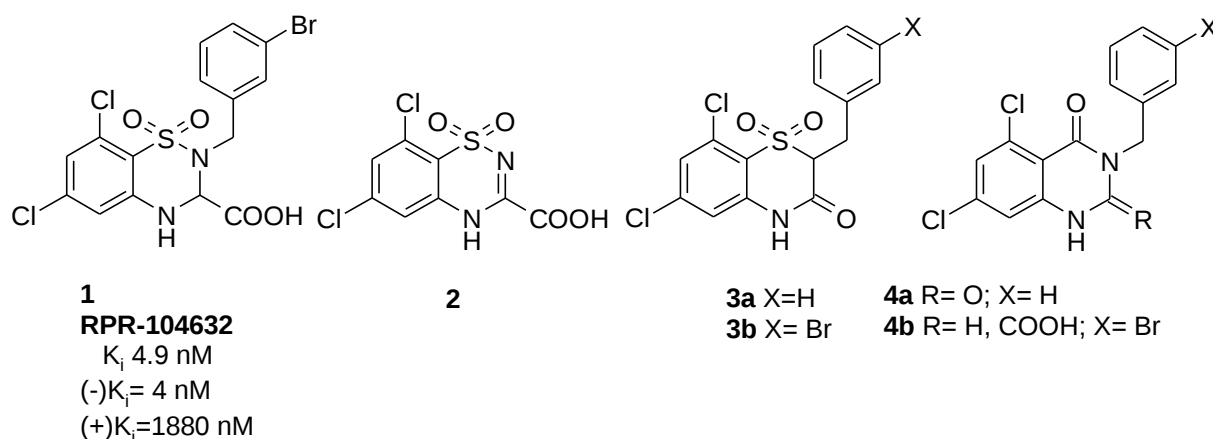
- 1) **Z. Bluke**, M. Sladek, V. Kauss. Synthesis of benzo[e][1,2]thiazine-3-carboxylic acid derivatives and their evaluation as NMDAR antagonists. In *Program & Book of Abstracts*, National Conference on Recent Trends in Organic Synthesis, February 24-26, 2011, (PP18), Tiruchirappalli, Tamilnadu, India.
- 2) **Z. Bluke**, V. Kauss. Asymmetric synthesis of 3,4-dihydro-2-substituted-2*H*-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxide. In *Program & Abstracts*, International Conference on Organic Synthesis (BOS-2012) Balticum Orgaicum Syntheticum, July 1-4, 2012, (PO13), Tallinn, Estonia.

### Publikācijas:

- 1) **Z. Bluke**, M. Sladek, U. Abel, V. Kauss. Evaluation of an enantioselective synthesis of 6-choloro-3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxide and its derivatives. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2015**, 51(2), 187-193.
- 2) **Z. Bluke**, E. Paass, M. Sladek, U. Abel, V. Kauss. Synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides and their evaluation as ligands for NMDA receptor glycine binding site. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Accepted for publication 09.04.2015. DOI: 10.3109/14756366.2015.1057722.

## PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

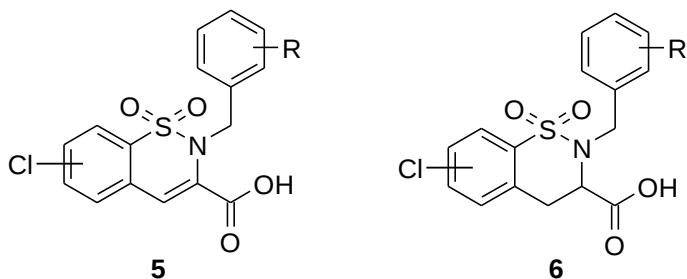
Literatūrā aprakstīti daudzi un strukturāli atšķirīgi NMDA receptora glicīna saistīšanās vietas antagonisti. Vienu no šiem augstas afinitātes ligandiem pārstāv savienojums **RPR-104632**. Sulfonamīda grupas nozīme struktūrā **1** augstas afinitātes nodrošināšanai līdz šim vēl nav noskaidrota. Arī spekulācijas, ka šī grupa veic NMDA antagonistu dihlorkinurēnskābes farmakoforu modelim atbilstošā ūdeņraža saites akceptora lomu, nav apstiprinātas. Turklāt, ievadot savienojuma **1** struktūrā sulfonamīda grupas vietā karboksamīda grupu, kas darbotos kā ūdeņraža saites akceptors, iegūtie savienojumi **4a** un **4b** neuzrādīja nekādu aktivitāti [<sup>3</sup>H]glicīna izspiešanas testā pat 100 μM koncentrācijā. Līdzīgu GlyB afinitātes zudumu novēroja arī savienojumu **3a** un **3b** gadījumā, kad karboksilgrupa bija aizstāta ar oksogrupu. Lai gan visas trīs modifikācijas pamatotas ar kādu no zināmiem farmakoforu modeļiem, iekļaujot NH grupu kā ūdeņraža saites donoru līdzīgi savienojumam **1**, tomēr tās visas ir neaktīvas.



1. att. **RPR-104632** struktūra un modeļa savienojumi

Mūsu interesi piesaistīja tas, ka savienojumam **2**, kura neaizvietotais analogs uzrāda aktivitāti radioliganda [<sup>3</sup>H]DCKA izspiešanas testā, ir plakana struktūra gan attēlotajā 4*H* tautomēra, gan 2*H* tautomēra formā. Aizvietojo benzotiadiazīna **2** 4-NH ar CH grupu, iegūstam savienojumu **5** ar sulfonamīda un karboksi funkcijām kā struktūrā **1**. Benzotiazīnam **5** tāpat kā savienojumam **2** raksturīga plakana simetriskā struktūra. Jāatzīmē, ka modeļsavienojuma **5** pamatstruktūra dod iespēju variēt aizvietotājus pie N atoma struktūras-aktivitātes izpētei. Otra modifikācija, kas likās ļoti atraktīva, bija benzotiazīna **5** plakanās struktūras izjaukšana, piesātinot C3-C4 saiti. Šāda vienkārša transformācija ļautu iegūt hirālā

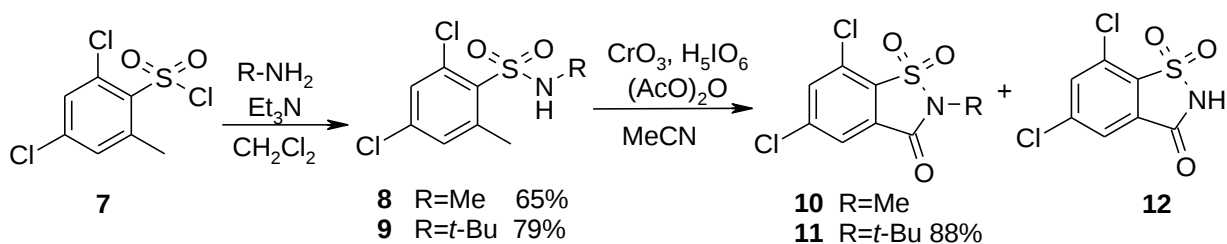
benzotiadiazīna **1** karbaanalogus, kuri potenciāli varētu saglabāt tā GlyB aktivitāti. Modelim **5** atbilstošās  $sp^2$  CH koncepcijas efektivitāte jaunu NMDA receptoru ligandu iegūšanai jau ir pierādīta naftalīnkarbonskābju rindā. Tas, ka visos tradicionālajos GlyB antagonistu farmakoforu modeļos postulēto ūdeņraža saites donoru (4-NH struktūrā **1**) varētu aizstāt ar  $sp^3$  CH, būtu pārsteidzoša novitāte.



2. att. Benzotiazīn-3-karbonskābes

### 1. 1,1-Diokso-2H-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju sintēze

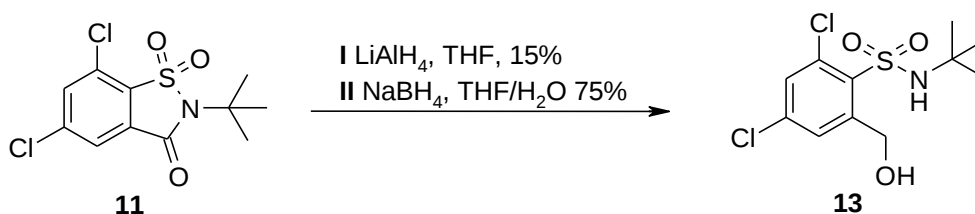
Mūsu mērķa savienojumus, benzotiazīnus **5**, iespējamajos NMDA receptora glicīna saistīšanās vietas antagonistus, ieguvām pēc literatūrā aprakstītās metodes.



3. att. Benzizotiazolu **10** un **11** sintēze

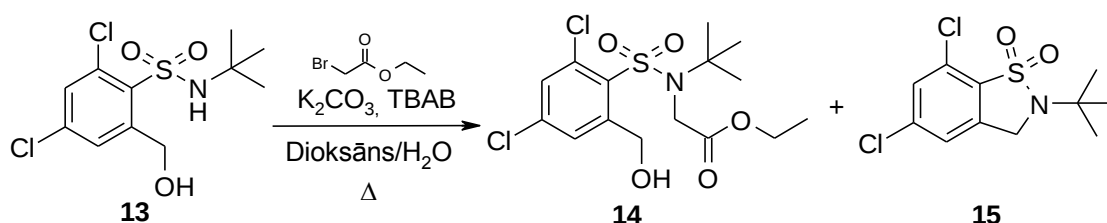
Sintēzi sākām no komerciāli pieejamā benzolsulfonilhlorīda **7** un tā reakcijā ar metilamīnu ieguvām benzolsulfonilamīdu **8**. Taču benzolsulfonamīda **8** oksidatīvajā ciklizācijā ar  $CrO_3$  un  $H_5IO_6$  veidojās benzizotiazola **10** un benzizotiazola **12** maisījums ar kopējo iznākumu 10%. Šāds rezultāts liecina par N-Me grupas vieglu oksidēšanos. Tāpēc sintezējām *tert*-butilsulfonamīdu **9**, kuru pakļāvam oksidatīvai ciklizācijai un benzizotiazolu **11** izdalījām ar augstu iznākumu.

Nākamais solis ir savienojuma **11** cikla atvēršana. Veicot benzizotiazīna **11** cikla atvēršanu pēc literatūrā aprakstītās metodes ar  $LiAlH_4$ , sulfonamīdu **13** ieguvām tikai ar 15% iznākumu. Nomainot  $LiAlH_4$  pret  $NaBH_4$ , vēlāmā produkta **13** iznākums sasniedza 75%.



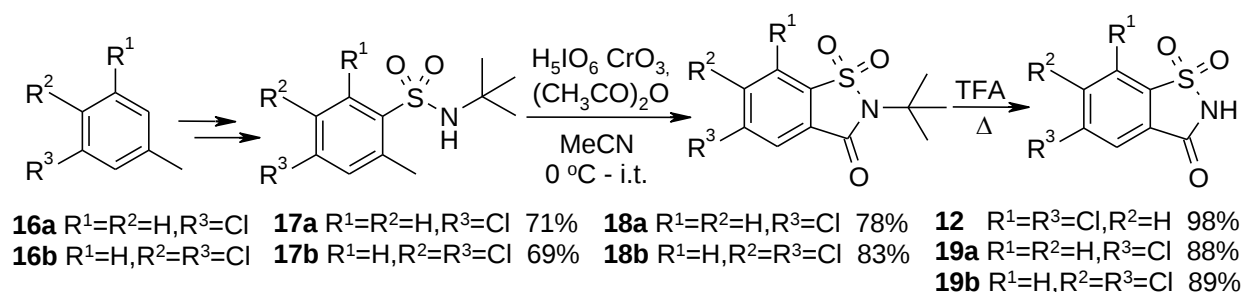
4. att. 1,1,3-Triokso-2H-benzizotiazola **11** reducēšana

Savienojuma **13** alkilēšanā ar etilbromacetātu, kā bāzi izmantojot NaH, vēlmais produkts **14** veidojās ar ļoti zemu iznākumu. No reakcijas maisījuma tika atgūta izejviela **13**. Optimizējot reakcijas apstākļus, kā bāzi izmantojām  $K_2CO_3$ . Taču kā galveno produktu izdalījām savienojumu **15**. No iegūtā rezultāta izriet secinājums, ka apjomīgā *tert*-butilgrupa rada stēriskus traucējumus *N*-alkilēšanai. Tāpēc tā tika nošķelta ar TFA un iegūtos benzizotiazolus aizsargājām ar *p*-metoksibenzilgrupu.



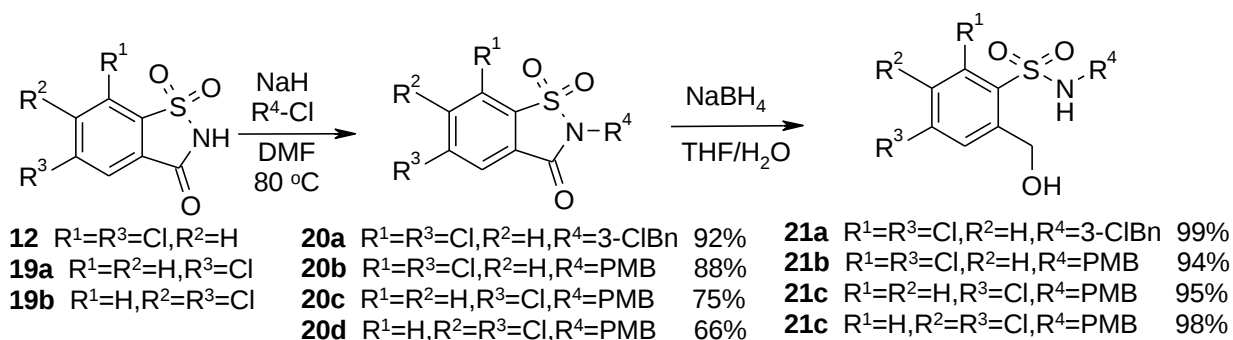
5. att. Alkilēšana  $K_2CO_3$  un TBAB klātbūtnē

5-Hlor- un 5,6-dihlorbenzotiazīnu **28** sintēzei nepieciešamās izejvielas - *N*-*t*-butilsulfonamīdus **18a** un **18b** - ieguvām 2 stadijās (sulfochlorēšana un reakcija ar *t*-BuNH<sub>2</sub>) no attiecīgajiem toluola atvasinājumiem **16a** un **16b**. Oksidatīvajā ciklizācijā izmantojām benzolsulfonamīdus **17a** un **17b**, kurus ciklizējām par 1,1,3-triokso-2H-benzizotiazoliem **18a** un **18b**. Savukārt pēc *t*-butilgrupas nošķelšanas ieguvām savienojumus **12**, **19a** un **19b**.



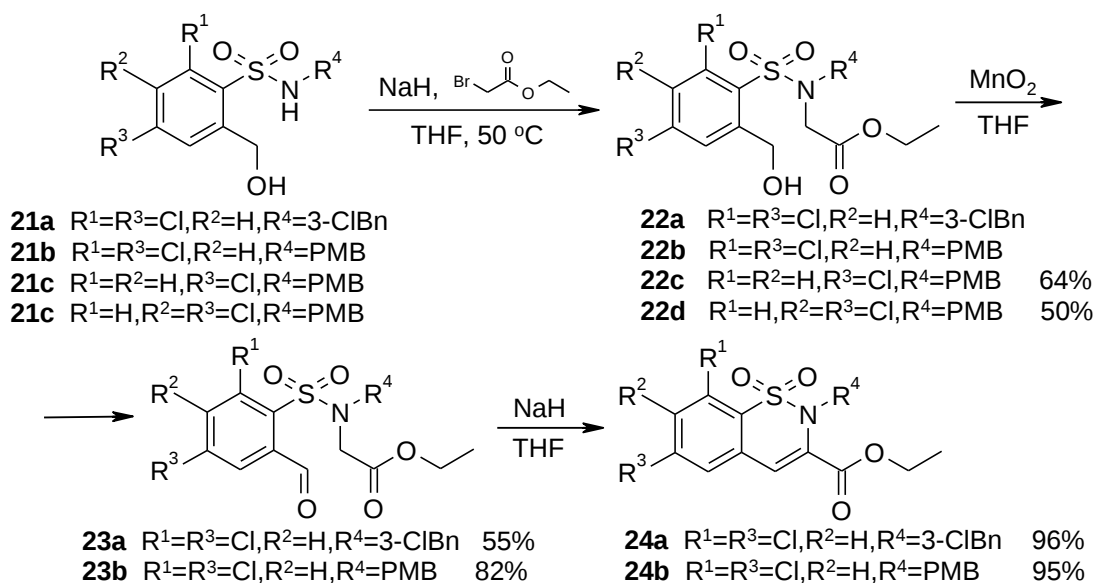
6. att. 1,1,3-Triokso-2H-benzizotiazolu sintēze

1,1,3-Triokso-2H-benzotiazolus **12**, **19a** un **19b** alkilējot ar benzilhlorīdiem ieguvām savienojumus **20**. Tos reducējot ar NaBH<sub>4</sub>, notiek cikla atvēršanās un veidojas benzolsulfonamīdi **21**.



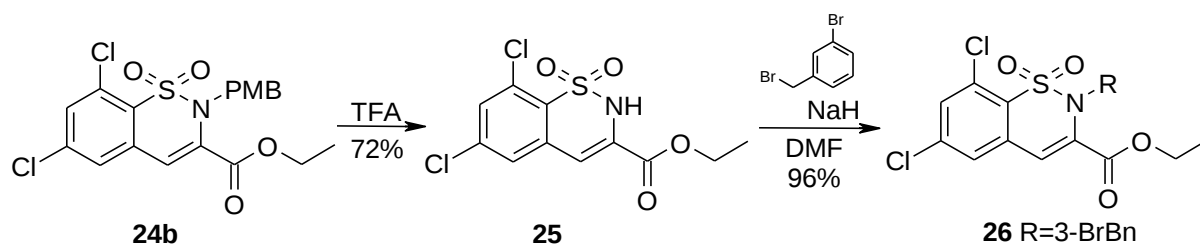
7. att. Benzolsulfonamīdu **21** sintēze

Alkilējot iegūtos savienojumus **21** ar etilbromacetātu, ieguvām benzolsulfonamīdētīkskābes etilesterus **22**. Sulfonamīdus **22** var izmantot kā izejvielas benzotiazīnu **5** un 3,4-dihidrobenzotiazīnu **6** sintēzē. Lai iegūtu savienojumus **24**, benzilspirtus **22a** un **22b** oksidējām ar  $MnO_2$  par aldehīdiem **23**. Tie, savukārt, viegli ciklizējās bāzes klātienē un veidoja benzotiazīnus **24**.



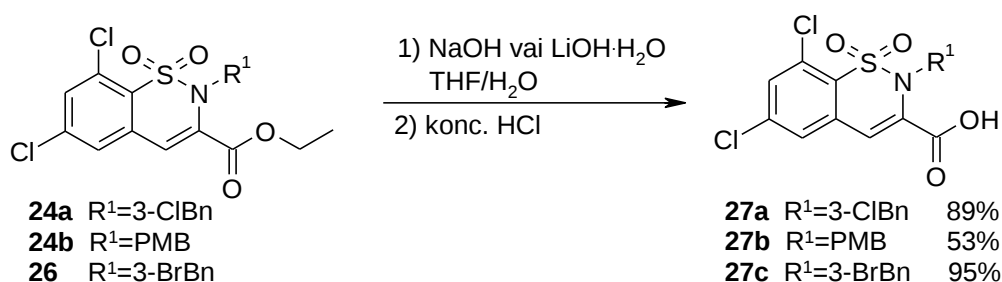
8. att. Benzotiazīnu **24** sintēze

Benzotiazīna **24b** PMB aizsarggrupas nošķelšana ar TFA dod savienojumu **25**, kuru var izmantot paralēlajai sintēzei, ievadot struktūras 2. pozīcijā nepieciešamos aizvietotājus. Alkilējot savienojumu **25** ar 3-brombenzilbromīdu ieguvām attiecīgo benzotiazīn-3-karbonskābes etilesteri **26**.



9. att. Benzotiazīn-3-karbonskābes etilestera **26** iegūšana

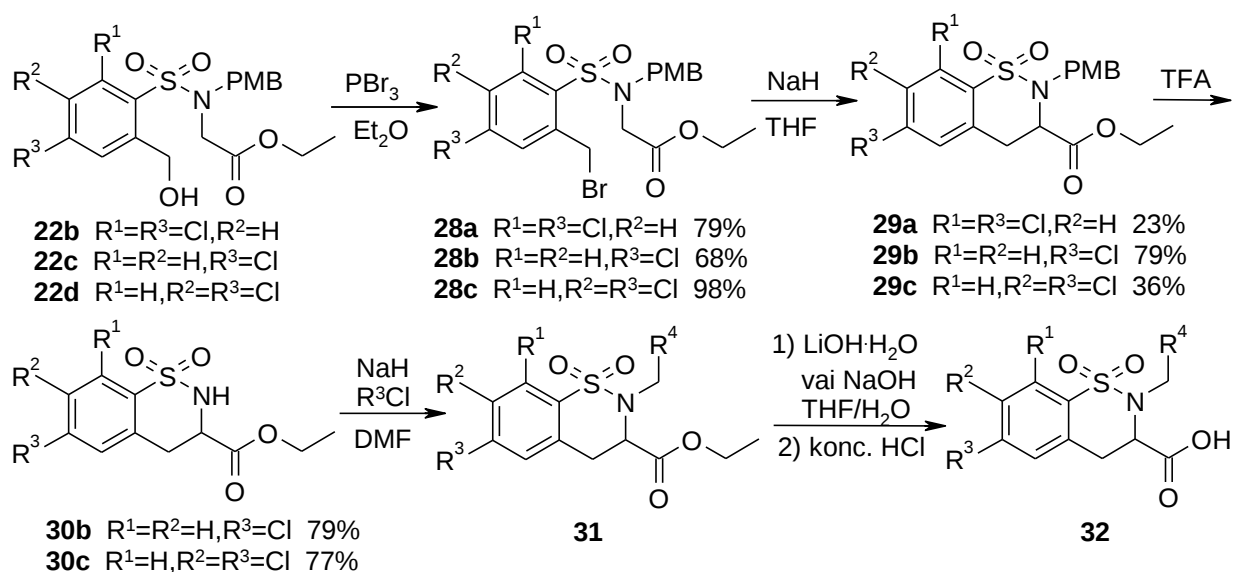
Noslēdzošā stadija mērķa savienojumu sintēzē ir klasiskā esteru **24a**, **24b** un **26** hidrolīze ar NaOH vai LiOH THF/H<sub>2</sub>O maisījumā, kuras rezultātā iegūst benzotiazīn-3-karbonskābes **27**.



10. att. Benzotiazīn-3-karbonskābju esteru hidrolīze

## 2. 1,1-Diokso-3,4-dihidro-2H-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju sintēze

Dihidrobenezotiazīn-3-karbonskābju metilesteru **29** iegūšanai nepieciešamos benzilbromīdus **28** pagatavojām benzilspirtu **22** reakcijā ar PBr<sub>3</sub>. Iedarbojoties uz savienojumiem **28** ar NaH, tos ciklizējam par attiecīgajiem benzotiazīniem **29**.



11. att. 3,4-Dihidrobenezotiazīn-3-karbonskābju **32** iegūšana

Nošķeļot benzotiazīnu PMB grupu, ieguvām savienojumus **30**, kurus izmantojām paralēlajā sintēzē ar aril- un heteroarilmetilhalogēniem. Savukārt no benzotiazīn-3-karbonskābes etilesteriem **31** bāziskās hidrolīzes reakcijā ieguvām nepieciešamās 3,4-dihidrobenzotiazīn-3-karbonskābes **32**. Alkilēšanas un hidrolīzes stadiju rezultāti atspoguļoti 1. tabulā. Benzotiazīnu alkilēšanas reakcijas iznākumi svārstās no zemiem līdz augstiem (6-96%) un ir atkarīgi no reakcijas laika un attiecīgā alkilētāja reaģētspējas. Esteru konversija hidrolīzē bija kvantitatīva un produktu iznākums samazinājās attīrīšanas procesā.

1. tabula

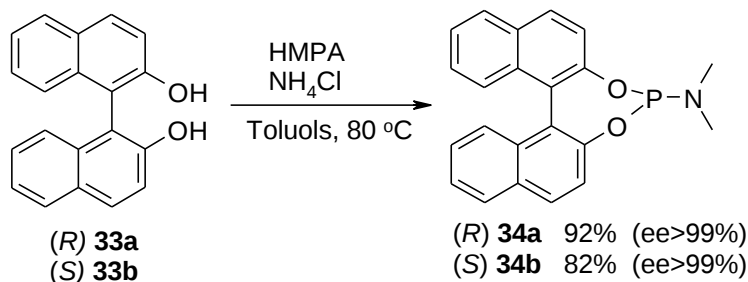
**Benzotiazīnu 31 N-alkilēšanas un esteru 32 hidrolīzes reakciju iznākumi**

| <b>R<sup>1</sup></b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>R<sup>3</sup></b> | <b>R<sup>4</sup></b>         | <b>Nr.</b> | <b>Iznākums<br/>alkilēšanā, %</b> | <b>Nr.</b> | <b>Iznākums<br/>hidrolīzē, %</b> |
|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|----------------------------------|
| Cl                   | H                    | Cl                   | 4-MeOPh                      | <b>31a</b> | -                                 | <b>32a</b> | 21                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-MeOPh                      | <b>31b</b> | -                                 | <b>32b</b> | 62                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-MeOPh                      | <b>31a</b> | 62                                | <b>32c</b> | 46                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-ClPh                       | <b>31b</b> | 42                                | <b>32d</b> | 50                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-ClPh                       | <b>31c</b> | 82                                | <b>32e</b> | 80                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 2-Py                         | <b>31f</b> | 6                                 | <b>32h</b> | 42                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-Py                         | <b>31g</b> | 34                                | <b>32i</b> | 42                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-(2-MeTh)                   | <b>31h</b> | 16                                | <b>32j</b> | 79                               |
| H                    | H                    | Cl                   | CO <sub>2</sub> <i>t</i> -Bu | <b>31i</b> | 74                                | <b>32k</b> | 75                               |
| H                    | H                    | Cl                   | Bn                           | <b>31j</b> | 33                                | <b>32l</b> | 52                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-MeOBn                      | <b>31k</b> | 50                                | <b>32m</b> | 89                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-FBn                        | <b>31n</b> | 39                                | <b>32p</b> | 92                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 2-FBn                        | <b>31o</b> | 29                                | <b>32q</b> | 55                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-MeOPhCO                    | <b>31r</b> | 42                                | <b>32s</b> | 58                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 2-MeOPhCO                    | <b>31s</b> | 70                                | <b>32t</b> | 71                               |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-FPhCO                      | <b>31t</b> | 77                                | <b>32v</b> | 72                               |
| H                    | Cl                   | Cl                   | 3-ClPh                       | <b>31w</b> | 96                                | <b>32x</b> | 38                               |

### 3. Enantioselektīva 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju sintēze

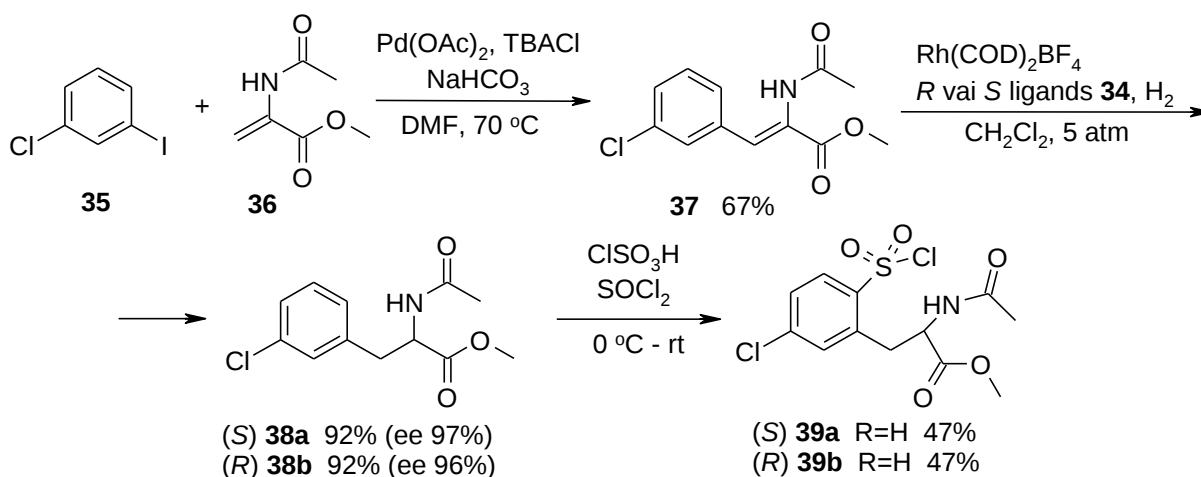
Viens no NMDA receptora antagonista **RPR104632** enantiomēriem uzrādīja gandrīz 500 reizes augstāku afinitāti nekā tā antipods. Kad izrādījās, ka mūsu attīstītā GlyB antagonistu dizaina sp<sup>3</sup> CH koncepcija darbojas 3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-

karbonskābju klasē, kļuva nepieciešams izstrādāt šo savienojumu enantioselektīvas sintēzes metodi. Izanalizējot iespējamās mērķa savienojumu sintēzes paņēmienus ar hirālā centra veidošanas stereokontroles iespējām, nonācām pie secinājuma, ka vispiemērotākais variants ir atbilstošu *N*-acetilfenilalanīna esteru enantioselektīva iegūšana no attiecīgajiem 2,3-dehidroanalogiem asimetriskās katalītiskās hidroģenēšanas ceļā.



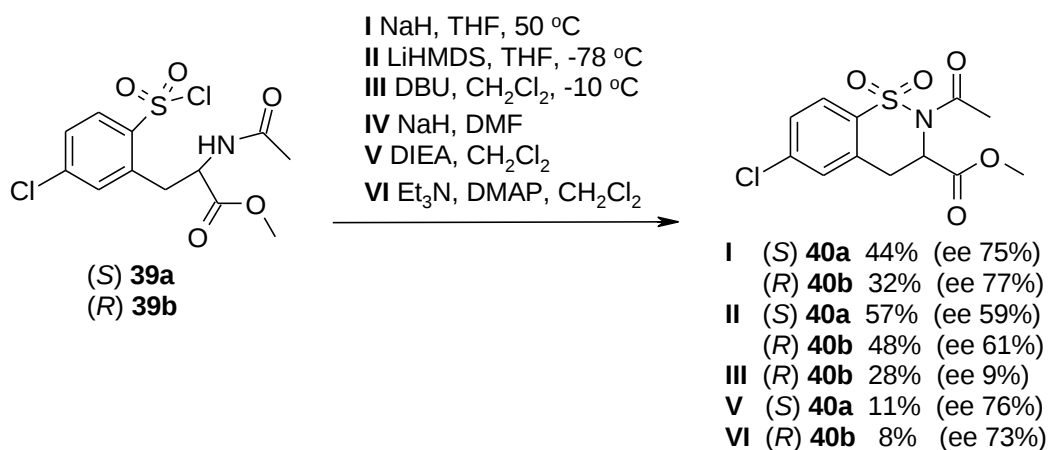
12. att. BINOL atvasinājumu **34** sintēze

Sintēzi sākām no jodbenzola **35** pēc *Jeffery* apstākļiem un tika iegūts savienojums **37** ar *Z* konfigurāciju. Šo savienojumu Rh katalizētā hidroģenēšanā, izmantojot BINOL atvasinājuma ligandus **34**, ieguvām *R* un *S* fenilalanīna atvasinājumus **38** ar augstu enantiomēro pārkāpumu. Savukārt, vajadzīgos BINOL ligandus **34** pagatavojām no komerciāli pieejamiem *R* un *S* 1,1-bi-2-naftoliem **33**. Fenilalanīna atvasinājumus **38** sulfohlorēšanas reakcijā pārvērtām par sulfonilhlorīdiem **39a** un **39b**.



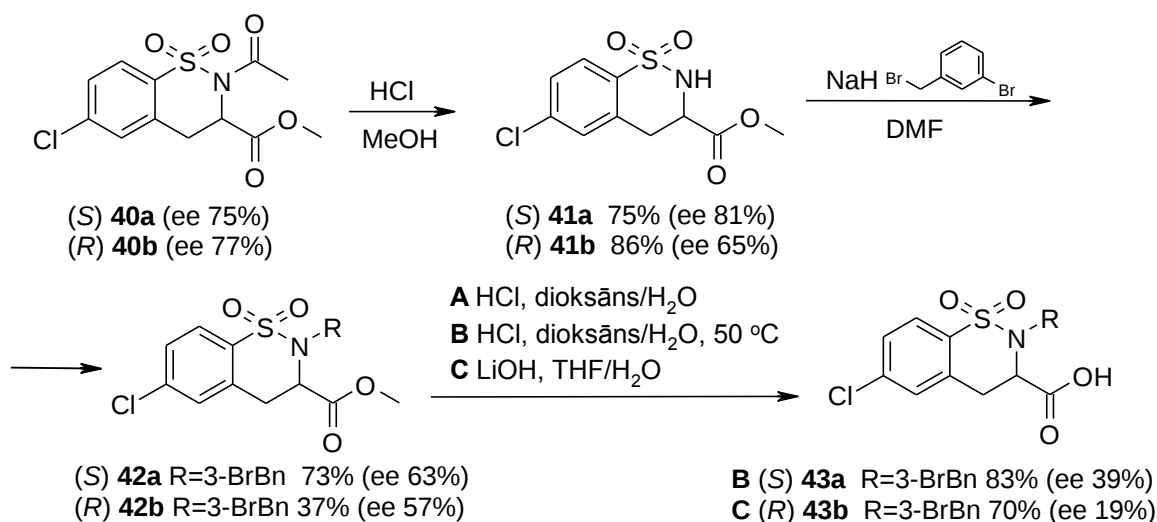
13. att. *Heck* reakcija un Rh asimetriskā hidroģenēšana

Nākamais solis ir iegūto sulfonilhlorīdu **39** ciklizācija par benzotiazīniem **40**. Lai izvērtētu iespējamās racemizācijas novēršanas iespējas, veicām vairākus eksperimentus.



14. att. Benzolsulfonilhlorīdu **39** ciklizācija

Vispirms ciklizācijas reakcijai kā bāzi izmantojām NaH un benzotiazīnus **40a** un **40b** izdalījām ar vidējiem iznākumiem. Šīs metodes trūkums ir sulfonilhlorīdu **39** zemā šķīdība THF, tāpēc THF vietā izmantojām DMF. Diemžēl šajos apstākļos rodas ļoti daudz blakusproduktu, ko novērojām pēc PSH. Nomainot NaH pret LiHMDS, vēlamos benzotiazīnus **40a** un **40b** ieguvām ar augstāku iznākumu. Taču, LiHMDS izraisa produktu daļēju racemizāciju. Racemizāciju izraisa arī DBU. Izmantojot DIEA, vēlamo produktu ieguvām tikai ar 11% iznākumu. Aprakstīta analogiska ciklizācijas reakcija DMAP klātbūtnē. Diemžēl DMAP pievienošana nepaaugstināja benzotiazīna **40b** iznākumu (8%, ee 73%), savukārt, pagarinot reakcijas laiku no 5 līdz 90 h, produkta iznākums paaugstinās līdz 28%, bet notiek daļēja racemizēšanās (ee 47%).

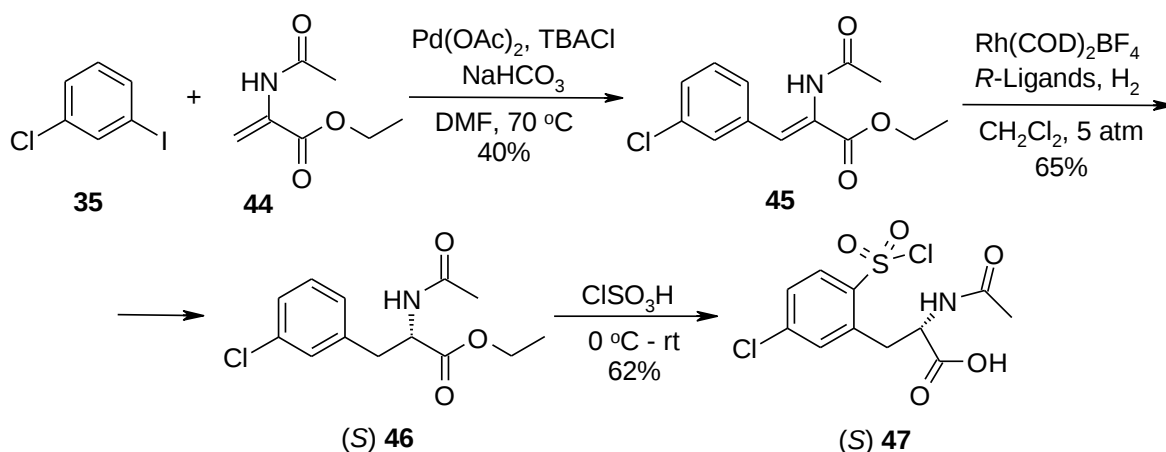


15. att. 3,4-Dihydrobenzotiazīnu **43** iegūšana

Pēc benzotiazīna ciklizācijas seko acetilgrupas nošķelšana, kuru veicām ar konc. HCl. Šajā reakcijā notiek daļēja racemizēšanās, ko parādīja savienojuma **41b** enantiomērās tīrības

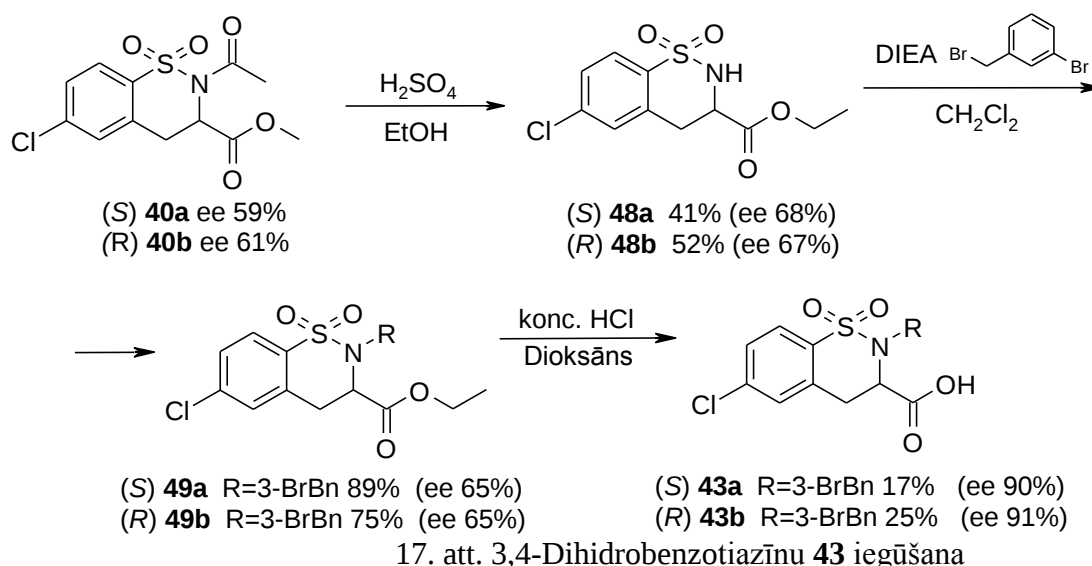
samazināšanās (ee 65%). Taču ee var paaugstināt mazgājot izdalīto produktu ar ēteri, kas ļauj iegūt S izomēru **41a** ar ee 81%. Arī alkilēšanas stadijā, kā bāzi izmantojot NaH, novērojām savienojumu **42** ee pazemināšanos. Pēdējā stadija mērķa savienojumu **43** sintēzē ir metilesteru hidrolīze. Istabas temperatūrā skābā vidē metilestera **42a** hidrolīzi realizēt neizdodas. Savukārt, paaugstinātā temperatūrā (50 °C) notiek racemizēšanās. Arī bāziskā hidrolīze izraisa racemizēšanos un benzotiazīnu **43b** ieguvām ar ee 19%.

Sakarā ar izteiktu benzotiazīn-3-karbonskābju **43** racemizēšanos metilesteru **42** apgrūtinātās hidrolīzes rezultātā, nolēmām sintetēt benzotiazīn-3-karbonskābes etilesterus **49**, kuri varētu hidrolizēties ātrāk, tādā veidā samazinot racemizācijas iespēju. Sintēzi sākām no 3-hlorjodbenzola (**35**) un etilakrilāta **44** un Heck reakcijā ieguvām savienojumu **45**, no kura tālāk enantioselektīvā hidrogenēšanā veidojās fenilalanīna atvasinājums **46**. Etilestera **46** sulfohlorēšana pēc jau izstrādātās metodes deva attiecīgo karbonskābi **47** ar 40% iznākumu. Estergrups hidrolīzi novērojām arī tad, ja sulfohlorēšanu veicām bez tionilhlorīda. No tā var secināt, ka estergrupas hidrolīze notiek apstrādājot reakcijas maisījumu ar ūdeni. Līdz ar to bija nepieciešams mainīt benzotiazīn-3-karbonskābes **49** sintēzes taktiku. Savukārt, etilestera vieglā hidrolīze liecināja par to, ka metilestera nomaīņa pret etilesteri patiešām varētu palīdzēt atrisināt enantioselektīvas sintēzes problēmu.



16. att. Heck reakcija un sulfohlorēšana

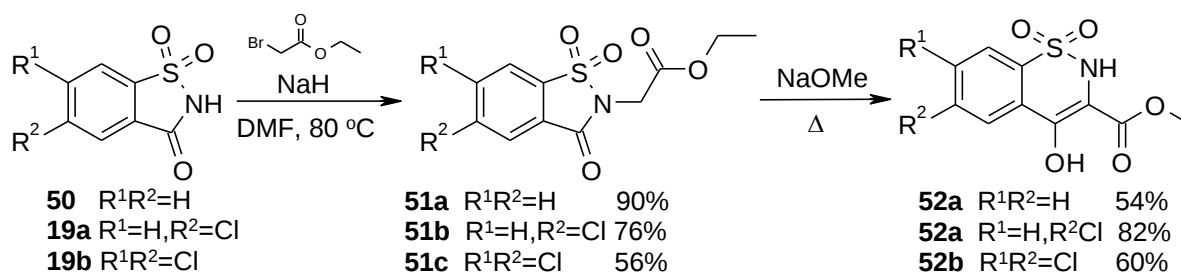
Ņemot vērā nevēlamo etilestera hidrolīzi sulfohlorēšanas stadijā, benzotiazīna **49** iegūšanai izmantojām alternatīvu pieeju – metilestera **40** pāresterificēšanos ar vienlaicīgu acetilgrupas nošķelšanu. Sintēzi veicām etilspirtā sērskābes klātbūtnē un ieguvām etilesterus **48** ar nelielu ee paaugstināšanos, kas notika kristalizācijas rezultātā no EtOH.



Iegūto savienojumu *N*-alkilēšanas reakcijā izdalījām benzotiazīnus **49** ar labiem iznākumiem. Mērķa savienojumu sintēzes pēdējā stadija ir etilestera hidrolīze. Reakciju veicām dioksānā HCl klātbūtnē un ieguvām benzotiazīnus **43**. Hidrolīze notika ļoti lēni, taču šajos apstākļos saglabājās savienojumu **43** optiskā tīrība (ee 65%), ko kontrolējām ar H-ŠH (hirālo šķidruma hromatogrāfiju). Produkta iznākums samazinājās izdalīšanas procesā. Arī šajā stadijā izdodas paaugstināt ee, produktu apstrādājot ar heksāna/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> šķīdumu.

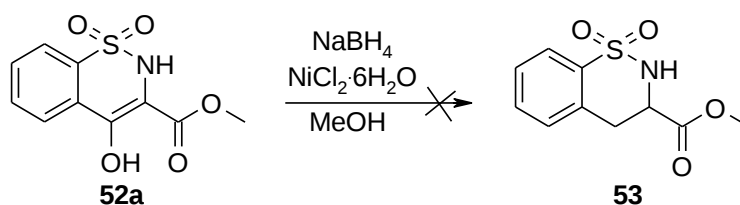
#### 4. 4-Hidroksi-1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīnu izmantošana 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīnu iegūšanai

Iepriekš apskatītajās benzotiazīn-3-karbonskābju **32** iegūšanas metodēs tiek izmantots garš sintēzes ceļš. Ļoti vilinoša iespēja minēto savienojumu iegūšanai būtu izmantot literatūrā plaši aprakstītos un viegli pagatavojamos 4-hidroksibenzotiazīnus **52a**, no kuriem, ja izdotos atrast piemērotu reducēšanas metodi, varētu ērti un lēti iegūt 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīnus un 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīnus. Viens sekmīgs šādas reducēšanas piemērs, izmantojot NaBH<sub>4</sub> niķeļa borīda klātbūtnē, ir minēts E. Paasa bakalaura darbā. Tāpēc tika nolemts rūpīgāk izpētīt šīs noliedzami interesantās reducēšanas reakcijas pielietošanas iespējas. Nepieciešamos 4-hidroksibenzotiazīnus ieguvām 2 stadijās no attiecīgajiem benzotiazoliem **19a**, **19b** un **50** *N*-alkilēšanā ar tai sekojošu *Dieckmann* tipa kondensāciju.



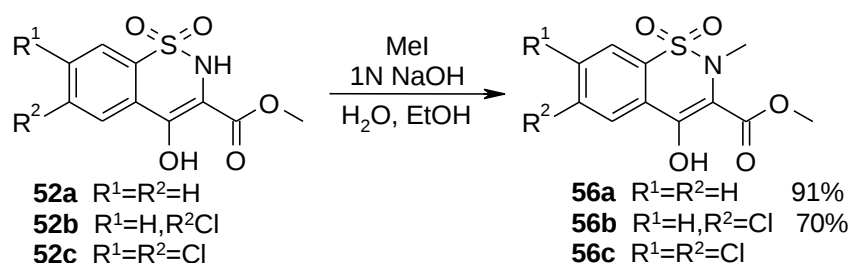
18. att. 4-Hidroksibenzotiazīnu **52** iegūšana

Vispirms pārbaudījām benzotiazīna **52a** reducēšanas iespēju ar  $NaBH_4$ , pievienojot  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ , taču vēlamo produktu **53** iegūt neizdevās. Secinājām, ka konjugētā  $\pi$  sistēma benzotiazīna **52a** struktūrā ir ļoti stabila un to nevar izjaukt ar  $Ni_xB_x$  un  $NaBH_4$ .



19. att. 4-Hidroksibenzotiazīna **52a** reducēšana

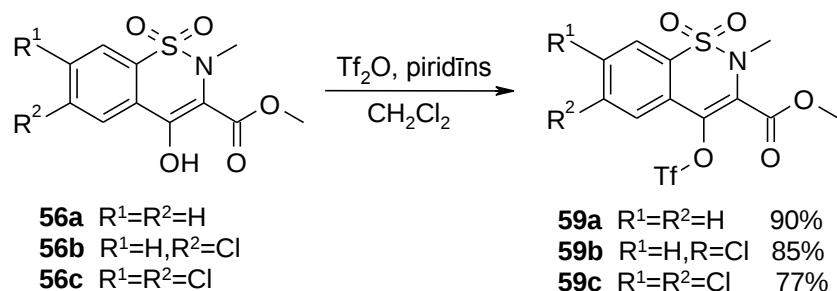
Benzotiazīna 4-hidroksigrupas aktivēšana bija drošāks paņēmieni, tāpēc veicām savienojuma **52a** hidroksigrupas mezilēšanu. Metānsulfoniloksigrupa ir laba aizejošā grupa, kas varētu atvieglot benzotiazīna reducēšanu. Taču reducēšanas mēģinājumā ar  $NaBH_4/NiCl_2 \cdot 6H_2O$  negaidīti notika mezilgrupas šķelšana un atguvām 4-hidroksibenzotiazīnu **52a**. Pieņemām, ka reakcijas norisi iespējams traucē tas, ka sulfonamīda grupa ir NH formā un varētu kompleksēties ar reducējošo aģentu. Tāpēc nolēmām sulfonamīda NH grupu alkilēt ar metiljodīdu. Alkilēšanu veicām EtOH/ $H_2O$  maisījumā NaOH klātbūtnē. Rezultātā ieguvām 2-metilbenzotiazīnus **56a** un **56b** ar augstiem iznākumiem.



22. att. Savienojumu **52** N-alkilēšana ar MeI

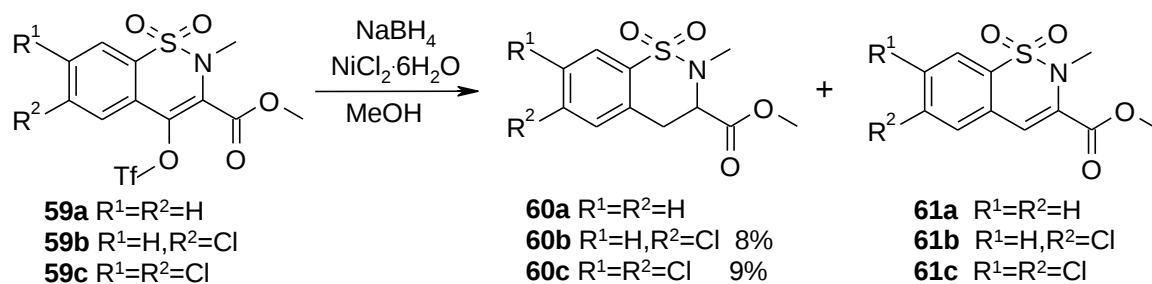
Taču arī 4-hidroksibenzotiazīna **56a** 4-hidroksi grupas aktivēšana ar mezilgrupu nedeva vēlamo rezultātu un reducēšanā neizdevās iegūt savienojumu **53**. Reakcijas norisi

iespējams traucēja benzotiazīna **57** sliktā šķīdība metanolā. Savukārt, sildot reakcijas maisījumu, benzotiazīns **57** sadalās. Lai nodrošinātu benzotiazīna pietiekamu šķīdību, reducēšanu atkārtojām THF. Diemžēl THF notiek arī karbonskābes metilestera reducēšana līdz spirtam. Reducēšana līdz spirtam tika novērota arī tad, ja kā reducējošo sistēmu izmanto  $\text{CuSO}_4/\text{NaBH}_4$ . Redzot, ka mezilatvasinājums **57** ir nešķīstošs MeOH, bet THF kā šķīdinātāju izmantot nevar, mezilgrupu nomainījām pret trifluormetānsulfonilgrupu. Tā, no savienojumiem **56** reakcijā ar  $\text{Tf}_2\text{O}$  ieguvām atbilstošos benzotiazīnus **59**.



24. att. Benzotiazīnu **56** reakcija ar  $\text{Tf}_2\text{O}$

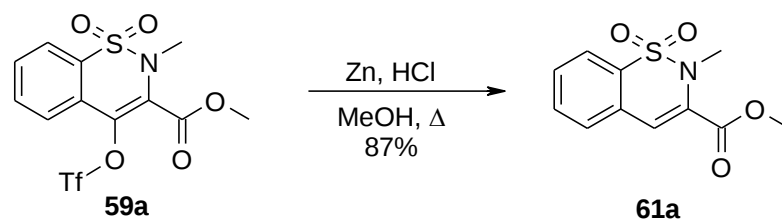
Benzotiazīna **59a** reakcijā ar  $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  galvenais trūkums ir 4-hidroksibenzotiazīna **56a** veidošanās, kas apstādina reakciju. Lai to novērstu veicām eksperimentus, mainot  $\text{NaBH}_4$  un  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  stehiometrijas attiecību. Vislabāko produkta **61a** un 4-hidroksibenzotiazīna **56a** attiecību (2:1, attiecīgi) ieguvām tad, ja reducēšanā tika izmantots 1 ekvivalents  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  un 2 ekvivalenti  $\text{NaBH}_4$ . Jāatzīmē, ja  $\text{NaBH}_4$  izmanto lielākā pārākumā vai reakciju veic ļoti ilgu laiku periodu, tiek novērota benzotiazīna **60a** estergrupas hidrolīze līdz karbonskābei vai reducēšana līdz spirtam.



25. att. Reducēšana ar  $\text{Ni}_x\text{B}_x/\text{NaBH}_4$

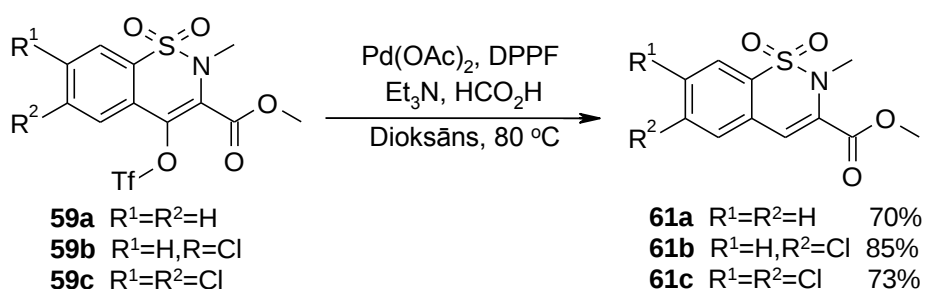
Nemot vērā to, ka mūs interesējošo benzotiazīnu struktūrā vajadzētu būt vismaz vienam halogēna atomam, pārbaudījām, kā niķeļa borīds reaģē ar hloru saturošiem benzotiazīniem **59b** un **59c**. Šo savienojumu šķīdība metanolā ir ievērojami zemāka, salīdzinot ar hlora atomus nesaturošo benzotiazīnu **59a**. Reducējot benzotiazīnus **59b** un **59c**

ar  $\text{Ni}_x\text{B}_x/\text{NaBH}_4$  ieguvām vēlamos produktus **60b** un **60c** ar 8% un 9% iznākumu, attiecīgi. Reakcijas maisījumā tika novērots arī neliels attiecīgā 4-hidroksibenzotiazīna (**56b** vai **56c**) daudzums. No reakcijas maisījuma pārsvarā tika izdalītas izejvielas **59b** un **59c**. Lai paaugstinātu substrātu šķīdību, izmantojām MeOH/THF maisījumu. Taču paaugstinoties šķīdībai, palielinās attiecīgo 4-hidroksibenzotiazīnu (**56b** un **56c**) veidošanās.



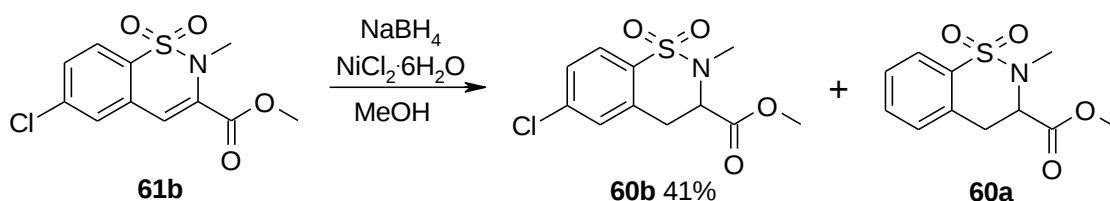
26. att. Reducēšana ar Zn/HCl

Kā alternatīvu risinājumu benzotiazīna **59a** reducēšanai izmantojām Zn/HCl metodi un savienojumu **61a** ieguvām ar augstu iznākumu. Savukārt, 6-hlor- un 6,7-dihlor aizvietotu benzotiazīnu **59b** un **59c** gadījumā novērojām attiecīgo piesātināto (**60b** vai **60c**), nepiesātināto (**61b** vai **61c**) un 4-hidroksibenzotiazīnu (**56b** vai **56c**) veidošanos.



27. att. Benzotiazīnu **59** deoksigenēšana

Turpinot pētījumus, mērķa savienojumu iegūšanai no 4-hidroksibenzotiazīniem, izmantojām arī ūdeņraža pārnesei hydrogenēšanu Pd katalizētā reakcijā. Kā ligandu izmantojot DPPF, benzotiazīnus **61** ieguvām ar augstiem iznākumiem. Reducējot benzotiazīnu **61b** ar  $\text{NaBH}_4$  un niķeļa borīdu ieguvām 3,4-dihidrobenezotiazīnu **60b** ar 41% iznākumu. Kā blakusprodukts veidojās arī dehalogenētais atvasinājums **60a**.



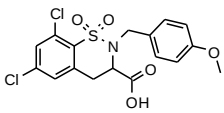
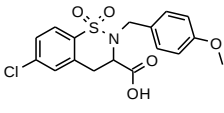
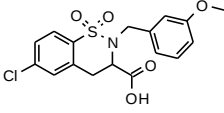
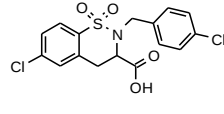
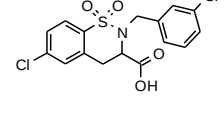
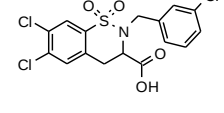
28. att. 3,4-Dihidrobenezotiazīna **60b** iegūšana

Benzotiazīnu **59** reducēšanas metodes ar  $\text{Ni}_x\text{B}_x$  un  $\text{NaBH}_4$  lielākais trūkums ir 4-hidroksibenzotiazīnu veidošanās, kas neļauj novest reakciju līdz pilnīgai konversijai. Alternatīvs veids kā iegūt 3,4-dihidrobenzotiazīnus ir 4-trifluormetānsulfoniloksi-2H-benzotiazīnu Pd-katalizētā ūdeņraža pārnese hidroģenēšana, kurai seko izdalīto benzotiazīnu C3-C4 dubultsaites reducēšana ar  $\text{Ni}_x\text{B}_x$  un  $\text{NaBH}_4$ . Diemžēl hloraizvietoto savienojumu gadījumā šīs metodes izmantošana noved pie daļējas dehalogenēšanas.

## 5. 1,1-Diokso-2H-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju *in vitro* GlyB aktivitāte

Sintezēto benzotiazīn-3-karbonskābju afinitāte uz NMDA receptora GlyB vietu tika noteikta radioliganda  $[^3\text{H}]\text{MDL-105.519}$  aizvietošanas testā žurkas smadzeņu šūnu membrānās.

2. tabula

| 3,4-Dihidro-2H-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju GlyB afinitāte |                                                                                     |                           |                                    |                                |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Nr.                                                          | Benzotiazīns                                                                        | Kontrole <sup>a</sup> , % | $\text{IC}_{50}^b$ , $\mu\text{M}$ | $\text{K}_i^c$ , $\mu\text{M}$ |
| 32a                                                          |   | 48                        |                                    |                                |
| 32b                                                          |  | 46                        |                                    |                                |
| 32c                                                          |  |                           | 3.7                                | 2.6                            |
| 32d                                                          |  |                           | 8.9                                | 6.2                            |
| 32e                                                          |  |                           | 2.8                                | 1.8                            |
| 32x                                                          |  | 55                        |                                    |                                |

a- radioliganda  $[^3\text{H}]\text{MDL-105.519}$  atlikums vielas 10  $\mu\text{M}$  koncentrācijas testā

b - koncentrācija pie kuras tiek aizvietoti 50% no radioliganda  $[^3\text{H}]\text{MDL-105.519}$  daudzuma

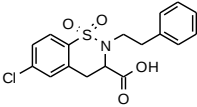
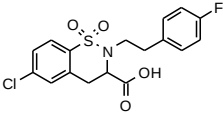
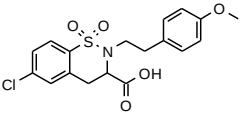
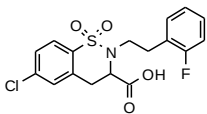
c - saistīšanās ar NMDA receptoru līdzsvara koncentrācija

Diemžēl mūsu pirmā koncepcija, kas balstījās uz benzotiazīna **2** modificēšanu, aizstājot cikla 4-NH grupu ar  $\text{sp}^2 \text{CH}$ , bija neveiksmīga. Tikai viena no 6,8-dihlor-1,1-diokso-

2H-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābēm **27a** – **27c** uzrādīja nelielu afinitāti (**27b**,  $K_i$  90  $\mu$ M) uz NMDA receptora glicīna saistīšanās vietu. Savukārt otra koncepcija, kas balstījās uz 3,4-dihidro-2H-1,2-benzotiazīnu struktūras attīstīšanu, bija veiksmīga un jau pirmais iegūtais šīs rindas savienojums **32a** uzrādīja vērā ņemamu GlyB afinitāti ( $IC_{50}$  ~10  $\mu$ M; sk. 2. tabulu). Jāatzīmē, ka 3,4-dihidro-1,2-benzotiazīnu klasē, tāpat kā vairāku uz kinurēnskābes modeļa dizainētu savienojumu rindā, cikla 6-Cl atoms nodrošina ievērojamu aktivitāti. Tomēr atšķirībā no pārējiem heterocikliem mūsu savienojumu rindā vēl viena halogēna atoma ievadīšana cikla 8. stāvoklī NMDA aktivitāti neuzlabo. Pie tam, 6-hlorbenzotiazīniem raksturīga ievērojami labāka šķīdība. Tāpēc pētījumus veicām ar 6-hlorbenzotiazīn-3-karbonskābēm. Struktūras-aktivitātes sakarību novērtēšanai sintezējām 3,4-dihidrobenezotiazīn-3-karbonskābes ar dažādiem aizvietotājiem 2. pozīcijā, jo optimāla kreisā – ierobežota apjoma hidrofobo mijiedarbību puse jau bija identificēta. Papildus pārbaudījām arī 6,7-dihlorbenzotiazīn-3-karbonskābes, taču arī šī divus halogēna atomus saturošā savienojuma **32x** šķīdība un aktivitāte izrādījās ievērojami zemākā līmenī. Skaidri saskatāma viena tendence, ka 2-benzilgrupas 3. stāvokļa aizvietotāji (gan elektronacceptorie, gan elektrondonorie) paaugstina benzotiazīnu (**32c**, **32e**) GlyB afinitāti salīdzinājumā ar benzilgredzena 4. pozīcijas aizvietotājiem (**32b**, **32d**).

3. tabula

3,4-Dihidro-2H-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju GlyB afinitāte

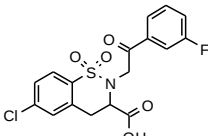
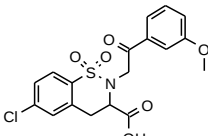
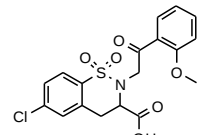
| Nr.        | Benzotiazīns                                                                        | Kontrole, % | Nr.        | Benzotiazīns                                                                         | Kontrole, % |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>32l</b> |  | 38          | <b>32p</b> |  | 64          |
| <b>32m</b> |  | 71          | <b>32q</b> |  | 40          |

Ievadot 3,4-dihidrobenezotiazīn-3-karbonskābju struktūrā 2-benzilgrupas vietā 2-feniletilgrupu, rindai kopumā (sk. 3. tabulu) GlyB aktivitāte samazinās. Redzams, ka tikai divi savienojumi (**32l** un **32q**) 10  $\mu$ M koncentrācijā aizvieto vairāk kā 50% radioliganda. Aktivitātes samazināšanās, salīdzinot ar 2. tabulā parādītajiem savienojumiem, varētu liecināt par to, ka šīs rindas savienojumu fenilgrupa ir pārāk tālu no slāpekļa atoma un nevar optimāli iekļauties receptora ZA hidrofoajā apgabalā. Izrādījās, ka šāds secinājums ir maldinošs, jo ievadot molekulā papildus ūdeņraža saites akceptoru grupu, iegūtie acetofenoni **32v** – **32t** (4.

tabula) uzrāda ievērojami augstāku aktivitāti kā 3. tabulā attēlotie 2-fenetilbenzotiazīni. Iespējams, ka oksogrūpa iesaistās papildus ūdeņraža saites veidojošā mijiedarbībā ar receptora arginīna atlikuma guanidino grupu, jo karboksilgrūpa un oksogrūpa ir tiešā tuvumā.

4. tabula

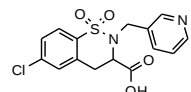
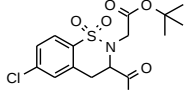
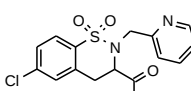
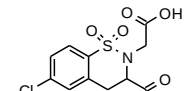
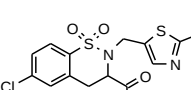
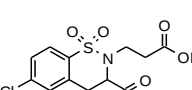
**3,4-Dihidro-2H-1,2-benzotiazīnu oksoetilatvasinājumu GlyB afinitāte**

| Nr. | Benzotiazīns                                                                       | IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> , μM | K <sub>i</sub> <sup>b</sup> , μM |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 32v |   | 7.2                                | 5.0                              |
| 32s |   | 1.5                                | 1.1                              |
| 32t |  | 2.1                                | 1.7                              |

Nemot vērā iepriekš minēto fenona grupu saturošo benzotiazīnu augsto aktivitāti, varēja sagaidīt, ka fenilgrupas aizstāšana ar heterociklu, kas var darboties kā ūdeņraža saites akceptors analogiski oksogrūpai, dos aktīvus savienojumus.

5. tabula

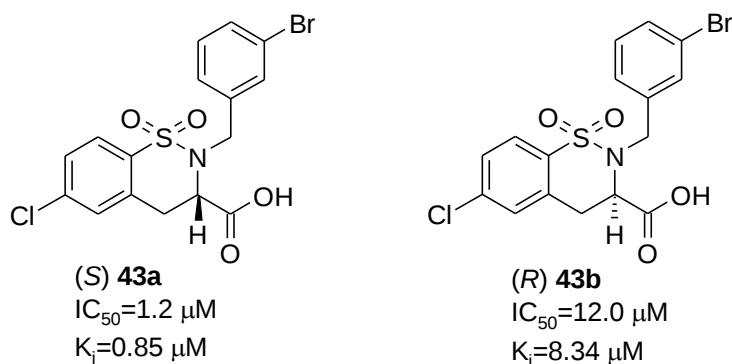
**3,4-Dihidro-2H-1,2-benzotiazīnu GlyB afinitāte**

| Nr. | Benzotiazīns                                                                        | Kontrole, % | Nr. | Benzotiazīns                                                                         | Kontrole, % |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 32i |  | 68          | 32k |  | 82          |
| 32h |  | 80          | 62  |  | 97          |
| 32j |  | 88          | 63  |  | 88          |

Izrādījās, ka šādi benzotiazīni (**32i**, **32h**, **32j**) ievērojami zaudē aktivitāti salīdzinājumā ar 2-benzilaizvietotiem analogiem. Lai pārbaudītu vai benzotiazīnu 2. stāvokļa aizvietotāja 2-

oksogrupai ir kāda funkcionāla nozīme bez fenilgrupas, tika testēts arī esteris **32k** un karbonskābe **62**. Kaut gan esterim **32k** un karbonskābei **62** skābekli saturošā funkcionālā grupa ir tajā pašā attālumā no cikla slāpekļa, tomēr aktivitāte nesaglabājas. Arī pagarinot alkilgrupas ķēdi, aktivitāte (dikarbonskābe **63**) neuzlabojas.

Vadoties pēc literatūrā aprakstītā NMDA receptora antagonista **1** datiem, kura (-)-izomērs uzrādīja aptuveni 500 reizes augstāku aktivitāti nekā tā (+)-izomērs, vēlējamies noskaidrot, vai mūsu 2-(3-brombenzil)-6-hlor-1,1-dioks-3,4-dihidro-2H-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes (**43**) enantiomēru GlyB afinitāte atšķirsies tik būtiski. Izrādījās, ka benzotiazīnkarbonskābes **43** enantiomērs (*S*)-**43a** ir tikai apmēram 10 reizes aktīvāks par (*R*)-enantiomēru **43b**.



29. att. Benzotiazīnkarbonskābes **43** enantiomēru GlyB afinitāte

Diemžēl iegūtās 3,4-dihidrobentotiazīn-3-karbonskābes **32** un **43** neuzrādīja mums nepieciešamo afinitāti uz NMDA receptora glicīna saistīšanās vietu, lai tiktu veikti *in vivo* funkcionālās aktivitātes pētījumi. Jāsecina, ka iegūto savienojumu klasē visperspektīvākais ir 2-(2-aril-2-oksoetil) aizvietoto 3,4-dihidro-2H-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju virziens.

## SECINĀJUMI

1. Izstrādāta 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju iegūšanas metode no 2-(4-metoksibenzil)-1,1,3-triokso-2*H*-benzo[d]izotiazoliem, izmantojot izotiazola cikla reducējošo atvēršanu, iegūtā 2-hidroksimetilbenzolsulfonamīda *N*-alkilēšanu ar etilbromacetātu un tai sekojošu hidroksimetilgrupas oksidēšanu par aldehīdgrupu, kas NaH ietekmē kondensējas ar *N*-karbmetoksimetilgrupu.
2. 2,4-Dihlor-*N*,6-dimetilbenzolsulfonamīda oksidatīvās ciklizācijas reakcijā ar hroma trioksīdu un periodskābi notiek arī *N*-metilgrupas oksidācija un veidojas 5,7-dihlor-1,1,3-triokso-2*H*-benzo[d]izotiazols.
3. Piemērotākā *N*-aizsarggrupa 6-(hidroksimetil)-2,4-dihlorbenzolsulfonamīda funkcionalizācijai un ciklizācijai ir *p*-metoksibenzil- nevis *terc*-butilgrupa, kuras stēriskais efekts nomāc *N*-alkilēšanu.
4. Izstrādāta 3,4-dihidro-1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju metilesteru enantioselektīva sintēze piecās stadijās, izmantojot ariljodīda Heck reakciju ar 2-acetilaminoetilakrilātu, tās produkta Rh katalizētu hidrogenēšanu, ar tai sekojošu sulfohlorēšanu, ciklizāciju NaH iedarbībā un *N*-acetilgrupas nošķelšanu ar HCl spirtā.
5. NaH ir piemērotākā bāze 2-acetilamino-3-(5-hlor-2-hlorsulfonilfenil)-propionskābes metilestera enantiomēru ciklizācijai, salīdzinot ar LiHMDS un DBU, kuri izraisa racemizāciju, un DMAP, kura deprotonēšanas spēja ir par vāju.
6. 2-(3-Brombenzil)-6-hlor-1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes metilestera skābā hidrolīze notiek tikai paaugstinātā temperatūrā, taču tāpat kā bāziskā hidrolīze izraisa racemizāciju.
7. 4-Hidroksi-2-metil-1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes metilesteris nereaģē ar NaBH<sub>4</sub>/NiCl<sub>2</sub> reducējošo sistēmu, bet apstrādājot ar NaBH<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> etilspirtā, reducējas ne tikai C3-C4 dubultsaite, bet arī estergrupa.
8. 4-Metānsulfoniloksi-2-metil-1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes metilestera C3-C4 dubultsaites un estergrupas reducēšana ar NaBH<sub>4</sub>/NiCl<sub>2</sub> tetrahidrofurānā ir neatkarīgi konkurējoši procesi.
9. 4-Trifluormetānsulfoniloksi-2-metil-1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes metilestera trifluormetānsulfoniloksigrupas reducēšana notiek ar augstu iznākumu, ja Pd katalizētā ūdeņraža pārnesei hidrogenēšanā kā ligandu izmanto 1,1'-bis(difenilfosfanil)ferrocēnu. Metode ir izmantojama arī analogisku hloraizvietoto benzotiazīnu reducēšanai.

10. Sintezēto 1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju GlyB afinitāte noteikta NMDA receptora radioliganda MDL-105,519 izspiešanas testā un iegūti sekojoši rezultāti:

- a) 1,1-diokso-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes ir neaktīvas;
- b) 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes uzrāda afinitāti mikromolārā līmenī;
- c) nomainot 1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābju struktūras *N*-benzilgrupu ar feniletil- vai heteroarilmetilgrupu, savienojumu aktivitāte dramatiski samazinās;
- d) ievadot aizvietotas *N*-feniletilgrupas 2. stāvoklī oksogrupu, savienojumu GlyB afinitāte sasniedz mikromolāru līmeni;
- e) 2-(3-Brombenzil)-1,1-diokso-3,4-dihidro-2*H*-1,2-benzotiazīn-3-karbonskābes *S* enantiomērs ir 10 reizes aktīvāks par tā antipodu.

## GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

### Topicality of the theme

Glutamate is the most abundant excitatory neurotransmitter in mammalian CNS and it activates ionotropic and metabotropic glutamate receptors. *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor, a subtype of ionotropic glutamate receptors, plays a major role in synaptic transmission, perception and memory modelling processes. An excessive stimulation of NMDA receptor, that is possible under hypoxia and neurodegenerative conditions, such as Alzheimer's and Huntington's disease, leads to neuronal death. NMDA receptor is a ligand gated ion channel, which is activated by endogenous glutamate, in the presence of co-agonist glycine. Therefore the glycine binding site (GlyB) represents an important pharmacological target and a number of high affinity GlyB antagonists have been identified. Generally accepted pharmacophore model of NMDA receptor GlyB ligand involves polar acidic function, as a crucial element responsible for interaction with the receptor's basic guanidine moiety of arginine. However a high polarity of such compounds prevents them from blood-brain barrier crossing. This was the main difficulty in the development of NMDA receptor glycine binding site antagonists as potential CNS therapeutic agents. During the last decade much attention has been turned to the peripheral NMDA receptors. Glutamate receptor activation holds an important role in pain processes that are related to nerve inflammation. Therefore the development of peripheral GlyB antagonists can lead to a new approach in the therapy of neuropathic pain.

### Aims and objectives

The main objective of this doctoral thesis is to develop a novel and less polar compounds acting at the glycine binding site of NMDA receptor. In order to do that it was necessary to summarize data on GlyB antagonists published over the last decade when the idea about its peripheral use has been established. One of the possible design pathways is a structure modification of untypical GlyB antagonist RPR-104632 by replacing 1,2,4-benzothiadiazine 4-NH group, that fits into generally accepted pharmacophore model, by a nonpolar  $sp^2$  and  $sp^3$  CH. The aim of the work is:

- 1) To develop synthetic methods toward 1,1-dioxo-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids and their 3,4-dihydro-analogues and to study the structure-activity relationships within the series.
- 2) To develop an asymmetric synthesis of 1,1-dioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids and to compare the affinity of both enantiomers.

- 3) Taking into consideration that the most studied and easily synthesized are 4-hydroxy-1,1-dioxo-2*H*-1,2-benzothiazines, it is important to clarify whether it's possible to develop a method of elimination and/or reduction of 4-hydroxy group, providing direct approach to 1,1-dioxo-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids and their 3,4-dihydro analogues.

### **Scientific novelty and main results**

Efficacy of  $sp^2$  CH concept in the design of new ligands for glycine binding site of NMDA receptor has already been shown in a series of naphthalenecarboxylic acids. However such compounds displayed low selectivity and additional polar acidic group in the structure was necessary to reach higher activity. Introduction of sulfonamide fragment in aromatic structure helps to solve these problems. Unfortunately only one of 1,1-dioxo-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids displayed weak GlyB affinity. However another concept based on use of  $sp^3$  CH was successful and several 1,1-dioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids showed remarkable activity. This is surprising novelty that traditionally postulated hydrogen bond donor in the traditional pharmacophore model of GlyB antagonist may be replaced by  $sp^3$  CH. This approach allows to widen the design of potentially selective ligands for NMDA receptor. Enantiodiscrimination of GlyB ligands in a series of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids is shown in the thesis – compound with (*S*)-configuration displayed 10 times stronger binding than (*R*)-isomer.

### **Structure and volume of main thesis**

Doctoral thesis is written in latvian and contains a review, discussion of results, experimental part and supplements. Review covers an information published during last 10 years when idea of peripheral application of NMDA receptor glycine binding site antagonists appeared. Additionally, an information on the synthesis of 1,1-dioxo-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids and their 3,4-dihydro analogues is reviewed. The discussion part of thesis describes the of synthesis of 1,1-dioxo-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids and their 3,4-dihydro analogues and a comparison of their activity. Asymmetric synthesis of 1,1-dioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids and evaluation of activity of both enantiomers is described. Evaluation of potential application of 4-hydroxy-2*H*-1,2-benzothiazine 1,1-dioxides in the synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides by reduction of 4-hydroxy group is described. Description of the synthesis and spectroscopic characterization of synthesized compounds is given in the experimental part.

## **Publications and approbation of the thesis**

Results of doctoral thesis has been presented at 2 international scientific conferences, published in one scientific paper and one manuscript accepted for publication.

### Poster presentation:

- 3) **Z. Bluke**, M. Sladek, V. Kauss. Synthesis of benzo[e][1,2]thiazine-3-carboxylic acid derivatives and their evaluation as NMDAR antagonists. In *Program & Book of Abstracts*, National Conference on Recent Trends in Organic Synthesis, February 24-26, 2011, (PP18), Tiruchirappalli, Tamilnadu, India.
- 4) **Z. Bluke**, V. Kauss. Asymmetric synthesis of 3,4-dihydro-2-substituted-2*H*-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxide. In *Program & Abstracts*, International Conference on Organic Synthesis (BOS-2012) Balticum Orgaicum Syntheticum, July 1-4, 2012, (PO13), Tallinn, Estonia.

### Publications:

- 3) **Z. Bluke**, M. Sladek, U. Abel, V. Kauss. Evaluation of an enantioselective synthesis of 6-choloro-3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxide and its derivatives. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2015**, 51(2), 187-193.
- 4) **Z. Bluke**, E. Paass, M. Sladek, U. Abel, V. Kauss. Synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides and their evaluation as ligands for NMDA receptor glycine binding site. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Accepted for publication 09.04.2015. DOI: 10.3109/14756366.2015.1057722.

## MAIN RESULTS OF THE THESIS

A considerable number of structurally diverse compounds have been reported in scientific literature as the glycine binding site antagonists of NMDA receptor. A high affinity ligand **RPR-104632** is among them (Figure 1). The role of sulfonamide functional group in high affinity maintenance is not clear yet. Speculation that this group mimics hydrogen bond acceptor function characteristic for the NMDA receptor antagonist dichlorokynurenic acid pharmacophore model has never been proved. Moreover, replacing the sulfonamide in structure **1** with the carboxamide function, that should also work as hydrogen bond acceptor, gives compounds **4a** and **4b** that are completely inactive in [<sup>3</sup>H]glycine displacement, even at 100  $\mu$ M concentration. Similar loss of GlyB affinity was observed in the case of compounds **3a** and **3b**, where carboxylic group was replaced with the oxo group. Although all three modifications are based on a known pharmacophore model, possessing the NH group as a hydrogen bond donor as in compound **1**, they are all inactive.

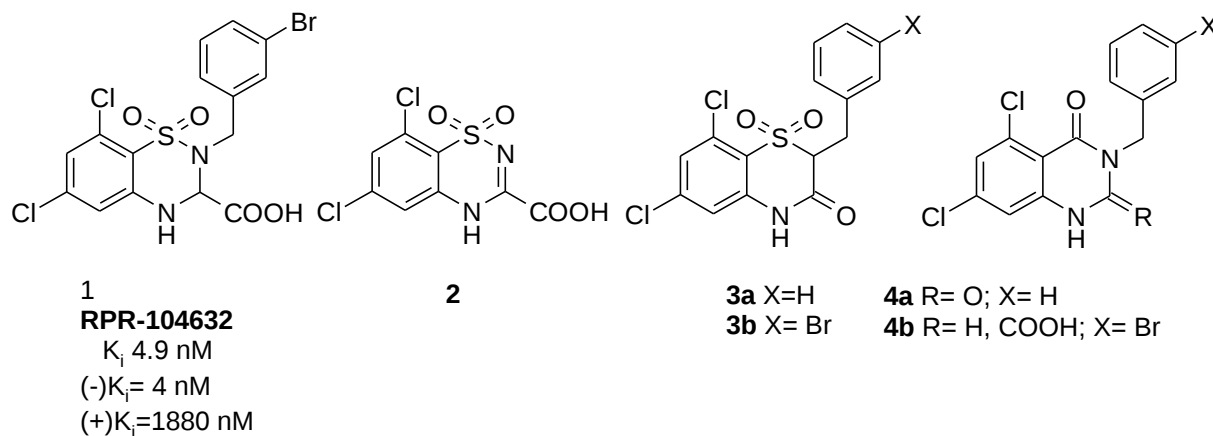


Figure 1. Structure of **RPR-104632** and model compounds

Our interest was attracted by the fact that compound **2**, whose unsubstituted analog showed activity in [<sup>3</sup>H]DCKA radioligand displacement assay, has a planar structure in both 4*H* and 2*H* tautomeric forms. By replacement of 4-NH in benzothiazine **2** with CH group we can obtain structure **5** with the sulfonamide and carboxy functions as in compound **1**. Benzothiazine **5** has a planar symmetrical structure similar to compound **2**. The structure **5** gives an opportunity to vary substituents on the nitrogen atom to explore structure-activity relationship. Another attractive modification is disarrangement of benzothiazine **5** planar structure by saturation of C3-C4 bond. This simple transformation would give a chiral benzothiazine **1** carbanalogs, that should potentially be able to maintain GlyB activity. The efficiency of the sp<sup>2</sup> CH concept, that is in agreement with the model **5**, in the design of new

NMDA receptor ligands has already been shown in a series of naphthalenecarboxylic acids. The fact that postulated hydrogen bond donor (4-NH in the structure **1**) in all traditional GlyB antagonist pharmacophore models could be replaced by  $sp^3$  CH would be a surprising novelty.

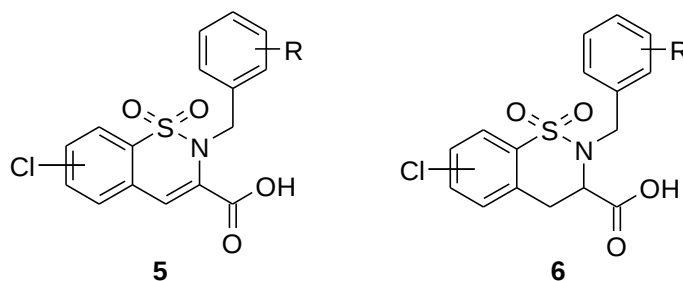


Figure 2. Benzothiazine-3-carboxylic acids

### 1. Synthesis of 2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides

Our target compounds, 2H-1,2-benzothiazine 1,1-dioxides **5**, potential NMDA receptor glycine binding site antagonists, has been prepared using a described method.

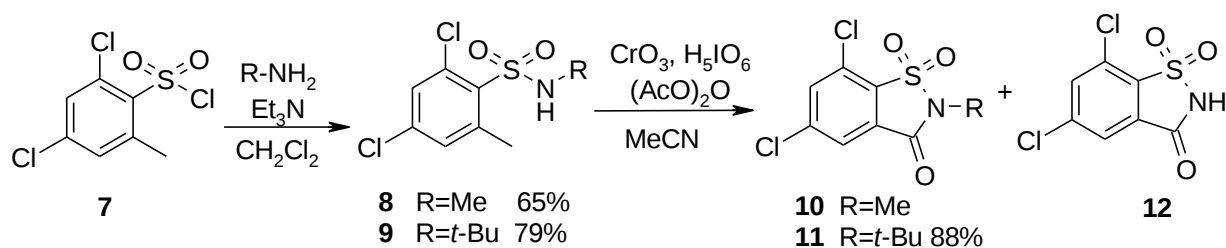


Figure 3. Preparation of benzo[d]isothiazol-3(2H)-one 1,1-dioxides **10** and **11**

We started the synthesis from a commercially available benzenesulfonyl chloride **7**. It gave *N*,6-dimethylbenzolsulfonylamide **8** in the reaction with methylamine. However further on oxidative cyclization of amide **8** with  $\text{CrO}_3$  and  $\text{H}_5\text{IO}_6$  resulted in a mixture of 2-methyl-1,1,3-trioxo-2H-benzo[d]isothiazole (**10**) and 1,1,3-trioxo-2H-benzo[d]isothiazole (**12**) in 10% total yield. This result suggested that *N*-Me group was readily oxidized. To escape unwanted side reaction we prepared *tert*-butylsulfonamide **9**, which was subjected to oxidative cyclization and 1,1,3-trioxo-2H-benzo[d]isothiazole **11** formed in 88% yield.

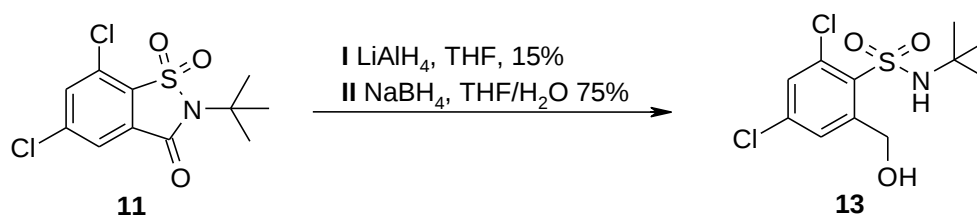


Figure 4. 2-*tert*-Butyl-5,7-dichloro-benzo[d]isothiazol-3(2H)-one 1,1-dioxide **11** reduction

The next step was isothiazol-3(2*H*)-one 1,1-dioxide ring opening. Performing benzisothiazole **11** ring opening reaction by a literature method with LiAlH<sub>4</sub>, benzenesulfonamide **13** formed in only 15% yield. The problem was solved by changing LiAlH<sub>4</sub> with NaBH<sub>4</sub> and the desired product **13** was obtained in 75% yield.

*N*-Alkylation of compound **13** with ethyl bromoacetate using NaH as a base gave the necessary amide **14** in only 10% yield. Starting compound **13** was recovered from the reaction mixture. In order to optimize the reaction conditions we used K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> as a base. However in these conditions compound **15** formed as a major reaction product. This result leads to a conclusion that bulky *tert*-butyl group causes sterical hindrance thus preventing *N*-alkylation. Therefore it was necessary to remove the *N*-*tert*-butyl group by TFA procedure and to protect the resulting benzisothiazoles with *p*-methoxybenzyl group.

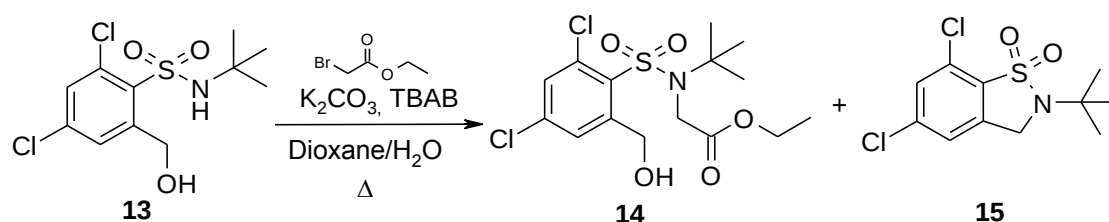


Figure 5. Alkylation in the presence of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and TBAB

*N*-*tert*-Butylsulfonamides **18a** and **18b** necessary for the synthesis of 5-chloro- and 5,6-dichloro-2*H*-1,2-benzothiazine **28** were prepared in two steps (sulfochlorination and reaction with *tert*-BuNH<sub>2</sub>) from the corresponding toluene derivatives **16a** and **16b**. The oxidative cyclization of benzenesulfonamides **17a** and **17b** gave the corresponding benzisothiazol-3(2*H*)-one 1,1-dioxides **18a** and **18b**. Further on the removal of *N*-*tert*-butyl group provided compounds **12**, **19a** and **19b**.

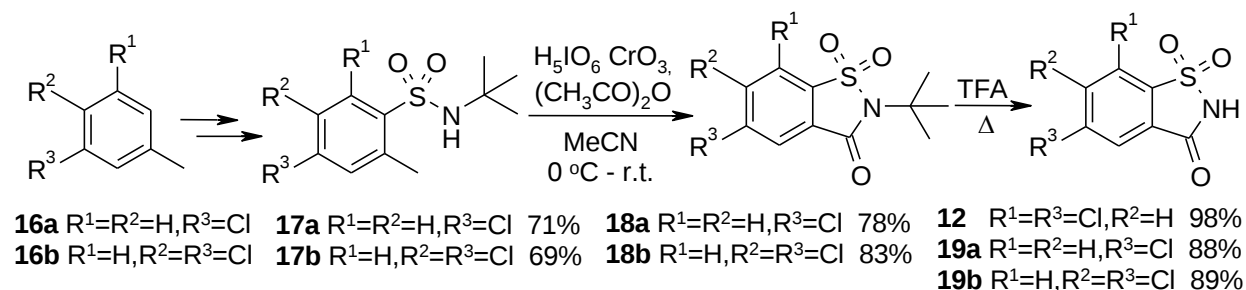


Figure 6. Preparation of benzo[d]isothiazol-3(2*H*)-one 1,1-dioxides

*N*-Alkylation of benzisothiazoles **12**, **19a** and **19b** with benzyl chlorides gave compounds **20**. Isothiazole ring opening to prepare benzenesulfonamides **21** was performed using reduction procedure with NaBH<sub>4</sub>.

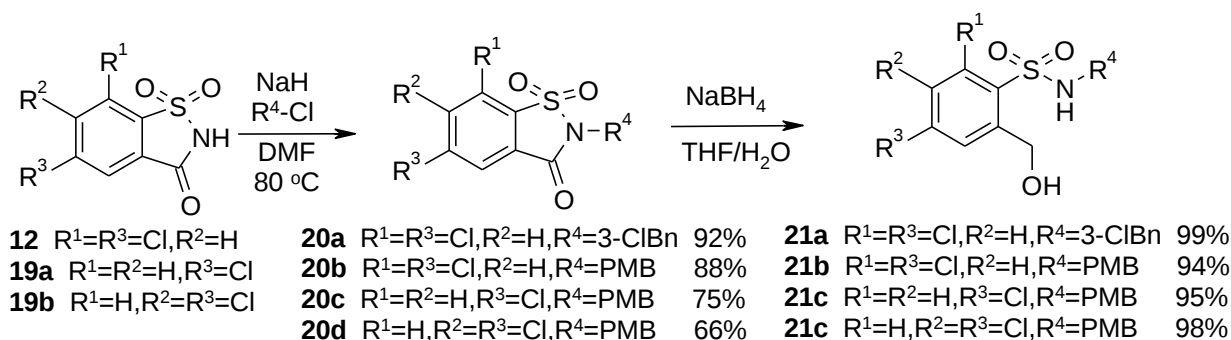


Figure 7. Preparation of benzenesulfonamides **21**

Alkylation of compounds **21** with ethyl bromoacetate resulted in ethyl sulfonamidoacetates **22**. The obtained benzenesulfonamides **22** can be used as a starting materials for the synthesis of benzothiazines **5** and 3,4-dihydrobenzothiazines **6**. In order to prepare benzothiazines **24**, benzyl alcohols **22a** and **22b** were oxidized with  $MnO_2$  to the corresponding aldehydes **23**. They were further converted to benzothiazines **24** by an intramolecular cyclization reaction.

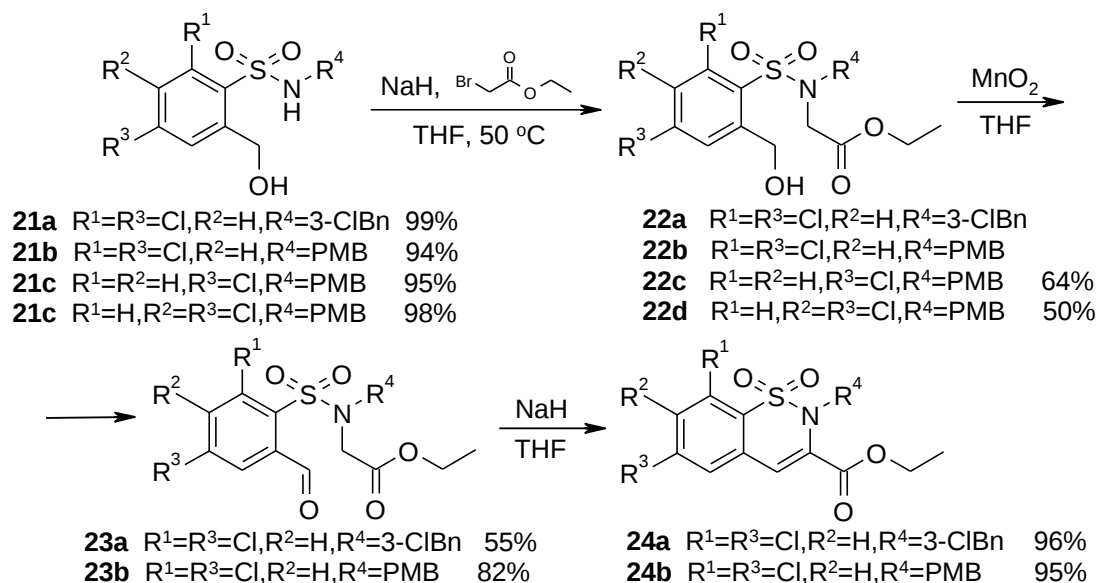


Figure 8. Preparation of ethyl 2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxides **24**

Removal of PMB protection in benzothiazine **24b** with TFA gives compound **25**, which can be used as a building block for parallel synthesis, introducing different substituents into the N-2 position of the core structure. Thus, N-alkylation of compound **25** with 3-bromobenzyl bromide gave corresponding derivative of ethyl benzothiazine-3-carboxylate **26**.

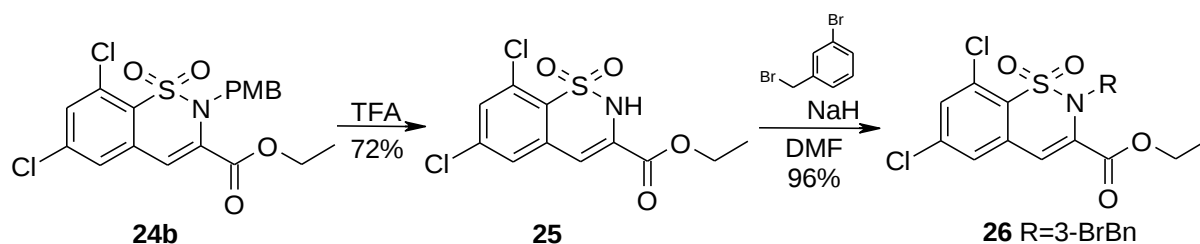


Figure 9. Preparation of ethyl 2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide **26**

The final step in the synthesis of target compounds is an ester group hydrolysis of ethyl esters **24a**, **24b** and **26** with NaOH or LiOH in THF/H<sub>2</sub>O mixture, resulting in formation of benzothiazine-3-carboxylic acids **27**.

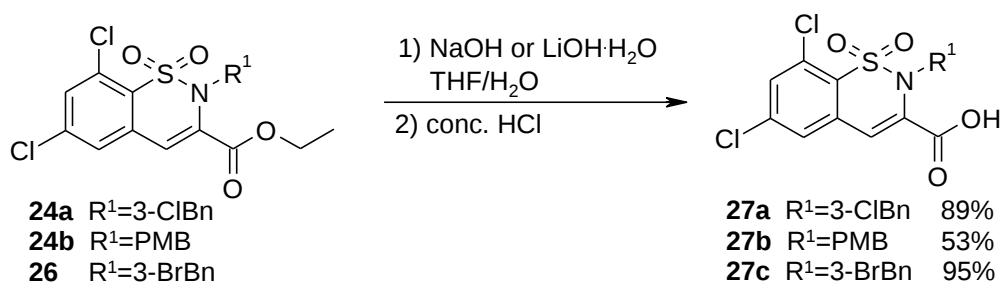


Figure 10. Hydrolysis of ethyl benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxides

## 2. Synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides

Aryl bromides **28**, necessary for the synthesis of dihydrobenzothiazines **29**, were prepared by transformation of aryl alcohols **22** with PBr<sub>3</sub>.

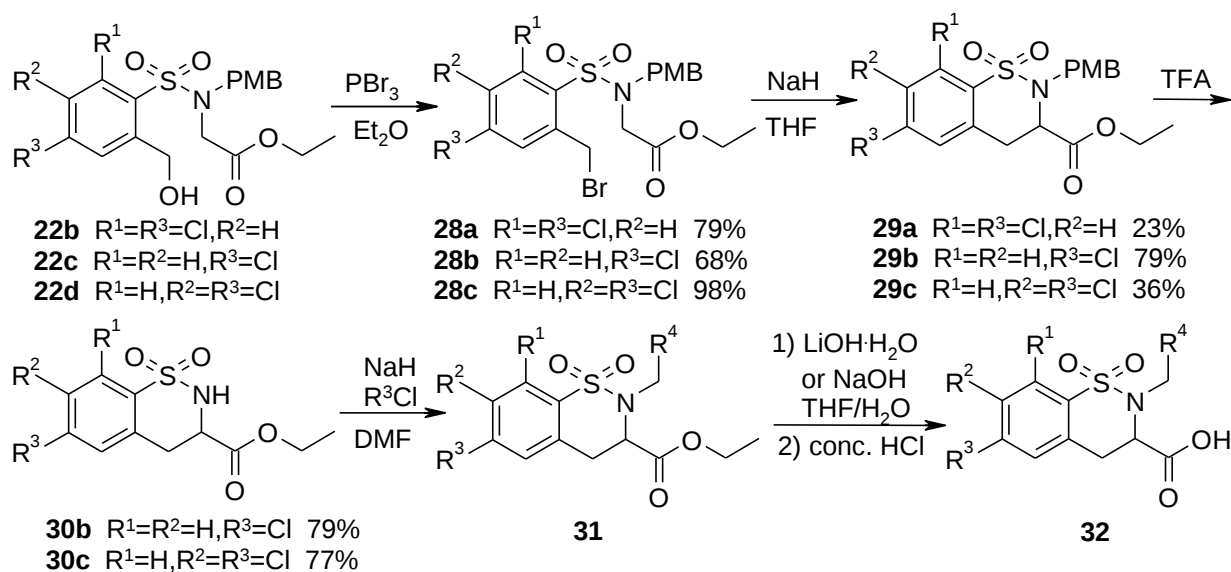


Figure 11. Preparation of 3,4-dihydrobenzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides **32**

Cyclization of aryl bromides **28** to the corresponding benzothiazines **29** occurred in the presence of catalytic amount of sodium hydride. Cleavage of PMB group was done by TFA

and gave compounds **30**, which could be used in parallel synthesis for alkylation with arylmethyl and heteroarylmethyl halides. The necessary 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides **32** were, in turn, prepared from esters **31** under basic hydrolysis conditions. The results of final steps are outlined in Table 1. Yields of benzothiazine *N*-alkylation reaction range from very poor to excellent (6-96%) and depend on the reaction time and the reactivity of corresponding alkylating agent. The conversion of esters in hydrolysis step was quantitative. The product yields diminished mainly during the purification process.

Table 1

**Yields of benzothiazine 31 *N*-alkylation and the ester hydrolysis**

| <b>R<sup>1</sup></b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>R<sup>3</sup></b> | <b>R<sup>4</sup></b>            | <b>Nr.</b> | <b>Alkylation<br/>yield, %</b> | <b>Nr.</b> | <b>Hydrolysis<br/>yield, %</b> |
|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|------------|--------------------------------|------------|--------------------------------|
| Cl                   | H                    | Cl                   | 4-MeOPh                         | <b>31a</b> | -                              | <b>32a</b> | 21                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-MeOPh                         | <b>31b</b> | -                              | <b>32b</b> | 62                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-MeOPh                         | <b>31a</b> | 62                             | <b>32c</b> | 46                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-ClPh                          | <b>31b</b> | 42                             | <b>32d</b> | 50                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-ClPh                          | <b>31c</b> | 82                             | <b>32e</b> | 80                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 2-Py                            | <b>31f</b> | 6                              | <b>32h</b> | 42                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-Py                            | <b>31g</b> | 34                             | <b>32i</b> | 42                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-(2-MeTh)                      | <b>31h</b> | 16                             | <b>32j</b> | 79                             |
| H                    | H                    | Cl                   | CO <sub>2</sub> <i>tert</i> -Bu | <b>31i</b> | 74                             | <b>32k</b> | 75                             |
| H                    | H                    | Cl                   | Bn                              | <b>31j</b> | 33                             | <b>32l</b> | 52                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-MeOBn                         | <b>31k</b> | 50                             | <b>32m</b> | 89                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 4-FBn                           | <b>31n</b> | 39                             | <b>32p</b> | 92                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 2-FBn                           | <b>31o</b> | 29                             | <b>32q</b> | 55                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-MeOPhCO                       | <b>31r</b> | 42                             | <b>32s</b> | 58                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 2-MeOPhCO                       | <b>31s</b> | 70                             | <b>32t</b> | 71                             |
| H                    | H                    | Cl                   | 3-FPhCO                         | <b>31t</b> | 77                             | <b>32v</b> | 72                             |
| H                    | Cl                   | Cl                   | 3-ClPh                          | <b>31w</b> | 96                             | <b>32x</b> | 38                             |

### 3. Enantioselective synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides

One of the NMDA receptor antagonist **RPR104632** enantiomers showed almost 500 times higher affinity over its antipode. As long as we found out that our GlyB antagonist sp<sup>3</sup> CH design concept works within the class of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic

acids, it became necessary to obtain both enantiomers of chiral benzothiazine-3-carboxylic acid. After going through the potential synthesis methods of the target compounds with an option of control of the chiral stereocenter formation, we came to a conclusion that the most appropriate way is the well known enantioselective synthesis of phenylalanine derivatives from the corresponding 2,3-dehydroanalogues by an asymmetric catalytic hydrogenation.

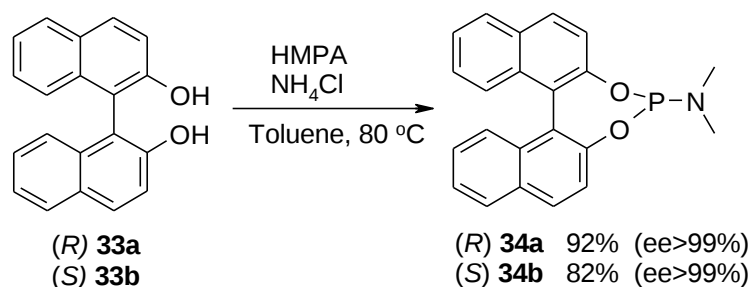


Figure 12. Preparation of BINOL derivatives **34**

We started the synthesis from iodobenzene **35**. Under *Jeffery* conditions it was transformed into compound **37** with *Z* configuration.

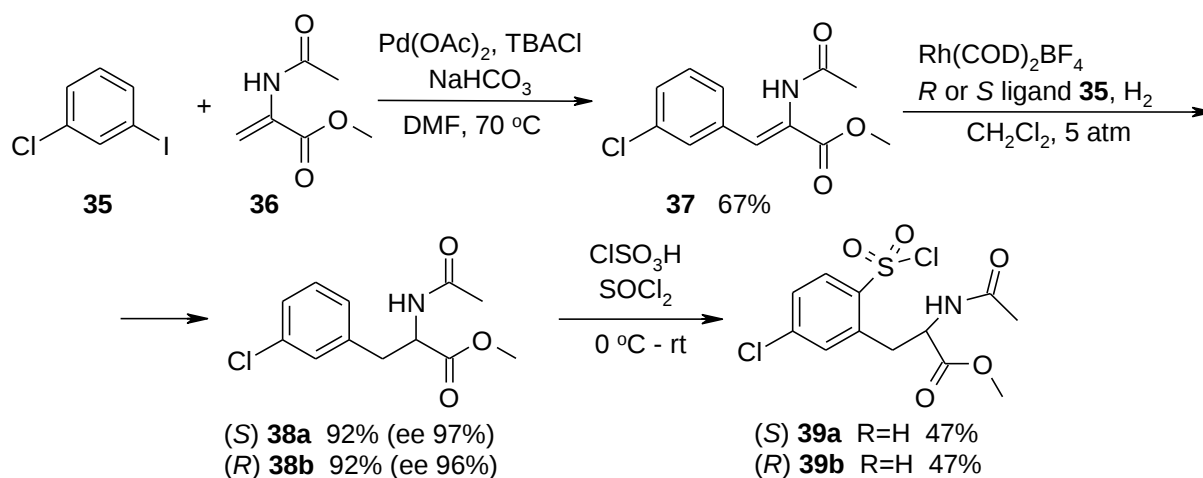


Figure 13. *Heck* reaction and Rh asymmetric hydrogenation

Arylacrylate **37** under Rh catalyzed hydrogenation conditions in the presence of BINOL-derived ligands **34** gave (*R*) and (*S*) phenylalanine derivatives **38** with high enantiomeric excess. BINOL ligands **34** were prepared from commercially available (*R*) and (*S*) 1,1-bi-2-naphthols **33** using published procedures. Phenylalanine derivatives **38** were transformed to benzenesulfonyl chlorides **39a** and **39b** in sulfochlorination reaction. The next step is cyclization of sulfonyl chloride **39** to benzothiazines **40**. In order to evaluate the possibility of preventing potential racemization we tested different reaction conditions.

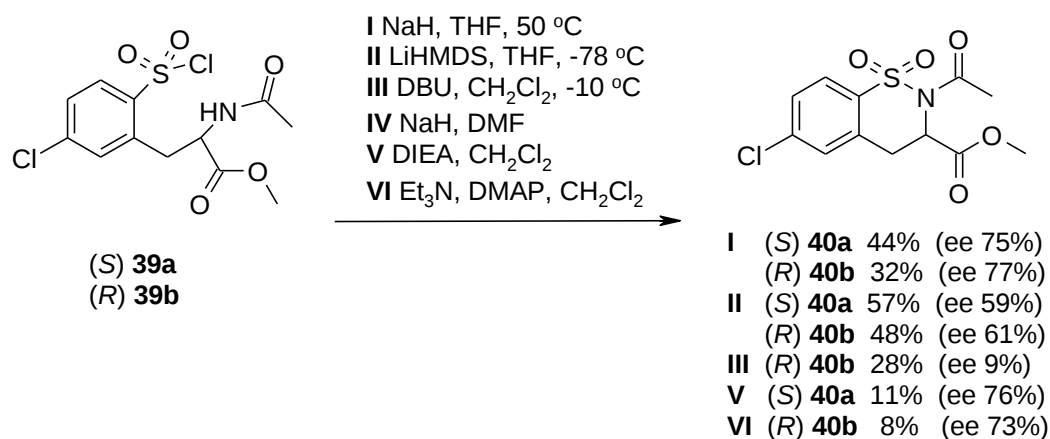


Figure 14. Benzenesulfonylchloride **39** cyclization

At first, we used NaH as a base in the cyclization reaction. In this case the yields of benzothiazines **40a** and **40b** were moderate. Serious drawback of this method was low solubility of sulfonyl chloride **39** in THF. Replacement of THF with DMF dramatically increased the number of byproducts of the reaction. By using LiHMDS instead of NaH, the desired benzothiazines **40a** and **40b** formed in higher yields. Though LiHMDS induced partial racemization of the product, DBU induced quite extensive racemization. Using DIEA, the cyclized product was obtained in only 11% yield. Similar cyclization has been described in the presence of DMAP. Unfortunately, in our case DMAP addition did not increase the yield of benzothiazine **40b** (8%, ee 73%). Increasing the reaction time from 5 to 90 h raised the yield of product up to 28%, however still partial racemization occurred (ee 47%).

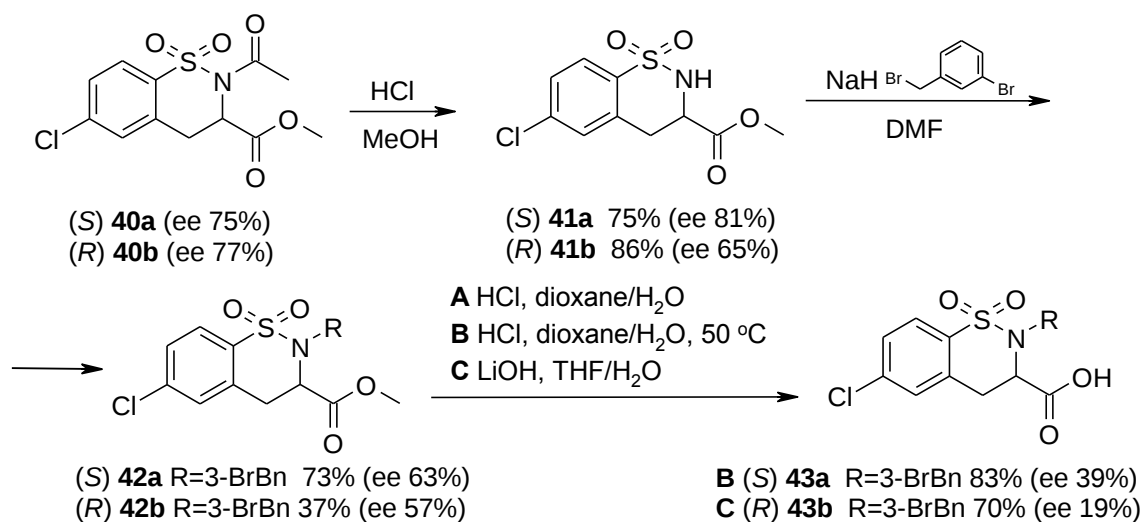


Figure 15. 3,4-Dihydrobenzothiazine **43** synthesis

Benzothiazine cyclization is followed by *N*-acetyl group removal, that was performed with conc. HCl. Partial racemization occurs in this reaction – enantiomeric purity of compound **41b** decreases (ee 65%). However ee can be increased by simple washing of

isolated product with diethyl ether, that allows to obtain (*S*) isomer **41a** with ee 81%. Also in the *N*-alkylation step, using NaH as a base, we observed ee decrease of compound **42**. The final step in the synthesis of target compound **43** is the hydrolysis. The hydrolysis of ester **42a** at room temperature under acidic conditions does not proceed. However by increasing the temperature (50 °C) an extensive racemization occurs. Basic conditions also induce racemization and the desired benzothiazine **43b** is obtained with 19% ee.

As long as considerable racemization of benzothiazine-3-carboxylic acid **43** occurred in the process of methyl ester **42** hydrolysis, we decided to prepare ethyl benzothiazin-3-carboxylates **49**, which potentially could be hydrolyzed faster, thus diminishing possibility of racemization. We started the synthesis from 3-chloriodobenzene (**35**) and ethyl 2-acetylaminoacrylate (**44**), which were transformed in *Heck* reaction to ethyl 2-acetylamino-3-(3-chlorophenyl)acrylate (**45**), followed by an enantioselective hydrogenation giving phenylalanine derivative **46**. Sulfochlorination of ethyl ester **46** by already developed method gave corresponding carboxylic acid **47** in 40% yield. However we observed the hydrolysis of ester group even when sulfochlorination reaction was performed without thionyl chloride. This means that hydrolysis occurs during the reaction workup with water. Therefore it was necessary to change the approach to ethyl 3,4-dihydro-1,2-benzothiazine-3-carboxylate **49**. Though, easy hydrolysis of ethyl ester proved that changing from the methyl ester to ethyl ester might help to resolve the problem of enantioselective synthesis.

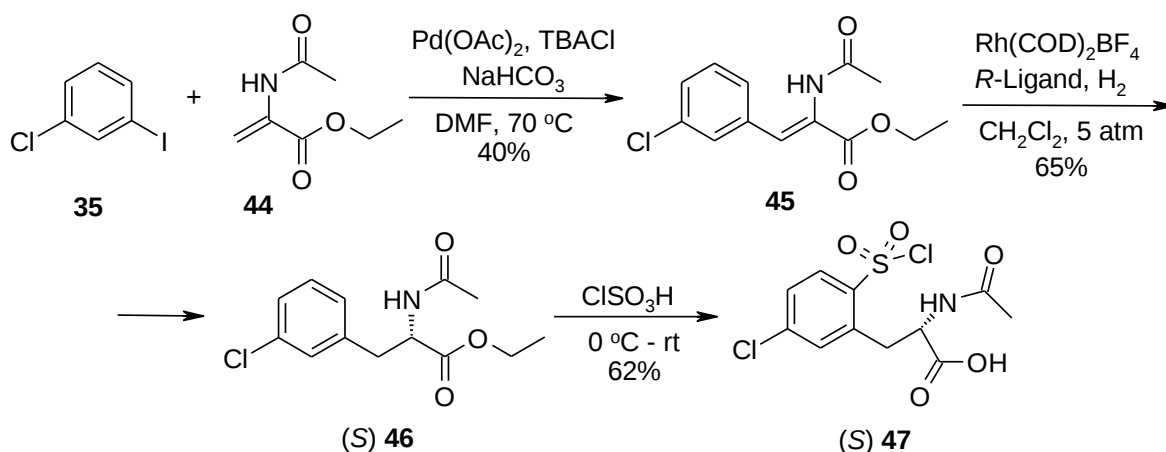


Figure 16. *Heck* reaction and sulfochlorination

Taking into account undesired hydrolysis of ethyl ester during the sulfochlorination step, we turned on an alternative approach to the ethyl benzothiazine-3-carboxylate **49** – transesterification of methyl ester **40** with simultaneous cleavage of acetyl group. The synthesis performed in ethanol in the presence of sulfuric acid gave the expected ethyl esters **48**. Crystallization of esters **48** from EtOH resulted in significant increase of ee.

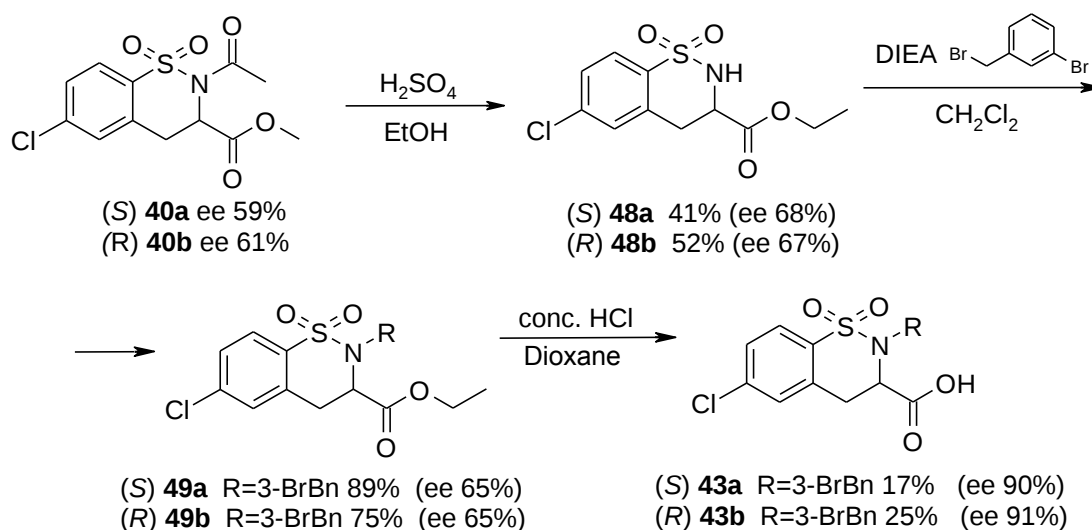


Figure 17. Synthesis of 3,4-dihydrobenzo[e][1,2]thiazine 1,1-dioxides **43**

Next, benzothiazines **49** were isolated in good yield after *N*-alkylation of obtained compounds **48**. The final step in the synthesis of target compound is the hydrolysis of ethyl ester group. Performing the reaction in dioxane in the presence of HCl gave benzothiazines **43**. Hydrolysis was very slow however optical purity of compound **43** maintained at the previous level (controlled by chiral HPLC). The yield of product decreased during the separation. In this case ee of the target compounds was increased by the treatment of product with hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution.

#### 4. Application of 4-hydroxy-2*H*-1,2-benzothiazine 1,1-dioxides in the synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine 1,1-dioxides

All previously described syntheses of benzothiazine-3-carboxylic acids **32** are quite lengthy and involve many steps. This prompted us to evaluate a possibility to use widely described and easily preparable 4-hydroxy-2*H*-1,2-benzothiazines **52a**. By using an appropriate reduction method these compounds could potentially be transformed into 2*H*-1,2-benzothiazine 1,1-dioxides and 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine 1,1-dioxides. An example of this kind of successful reduction, using NaBH<sub>4</sub> in the presence of nickel boride, has been referred in E. Paas bachelor thesis. Therefore we decided to explore the applicability of this interesting reduction to our case. The requested 4-hydroxybenzothiazines were synthesized in two steps from the corresponding benzoisothiazoles **19a**, **19b** and **50** by *N*-alkylation reaction followed by Dieckmann condensation.

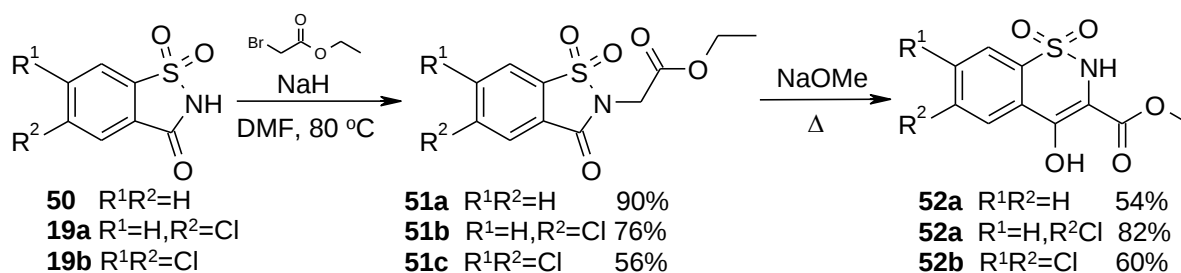


Figure 18. 4-Hydroxybenzothiazine 52 synthesis

First we checked the possibility of benzothiazine **52a** reduction with  $NaBH_4$ , in the presence of  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ , however the desired product **53** was not detected. We came to a conclusion that conjugated  $\pi$  system of benzothiazine **52a** is stabilized therefore difficult to break with  $Ni_xB_x$  and  $NaBH_4$ .

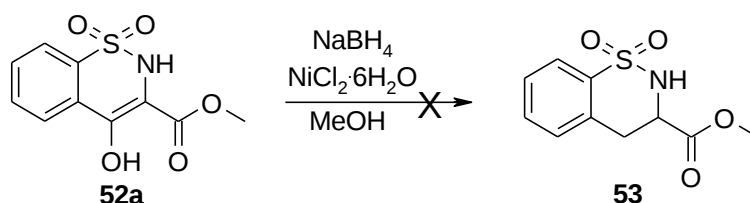


Figure 19. 4-Hydroxybenzothiazine **52a** reduction

Activation of benzothiazine 4-hydroxy group seemed to be much more promising method to facilitate the reduction, therefore we mesylated the hydroxy group of benzothiazine **52a**. Methanesulfonyl group is good leaving group and this can facilitate benzothiazine reduction. Unexpectedly, during the reduction of benzothiazine with  $NaBH_4/NiCl_2 \cdot 6H_2O$  system the mesyl group has been cleaved and we recovered 4-hydroxybenzothiazine **52a**.

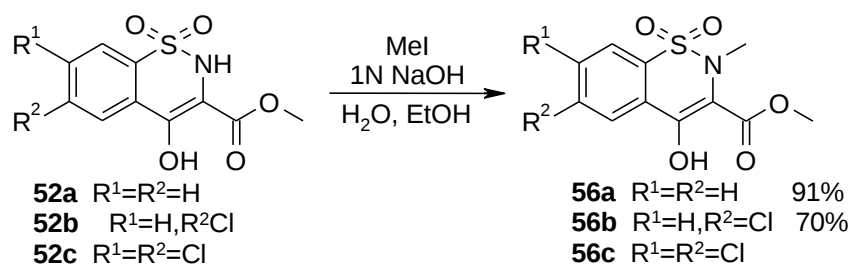


Figure 22. N-Alkylation of compounds **52** with MeI

We assumed that the progress of reaction is obstructed due to the fact that the NH in sulfonamide group is complexed with the reducing agent. To exclude this possibility we decided to alkylate sulfonamide NH with iodomethane. Alkylation was performed in EtOH/ $H_2O$  mixture in the presence of NaOH. As a result we obtained 2-methylbenzothiazines

**56a** and **56b** in high yields. Activation of compound **56a** with mesyl group appeared ineffective and we could not obtain compound **53**. We assumed that the reason of such result was low solubility of benzothiazine **57** in methanol. Unfortunately, warming of the reaction mixture lead to decomposition of mesylate **57**. To ensure that benzothiazine is dissolved in the reaction media, we repeated the reaction in THF. Unfortunately, methyl ester of carboxylic acid was reduced to alcohol in THF. Reduction of ester group was observed even when  $\text{CuSO}_4/\text{NaBH}_4$  was used as a reductive system. As long as mesyl derivative was insoluble in MeOH, and THF could not be used as a solvent too, we changed mesyl group to triflyl group. Thus 4-hydroxybenzothiazines **56** formed the corresponding 4-trifluoromethanesulfonyloxy-benzothiazines **59** in the reaction with  $\text{Tf}_2\text{O}$ .

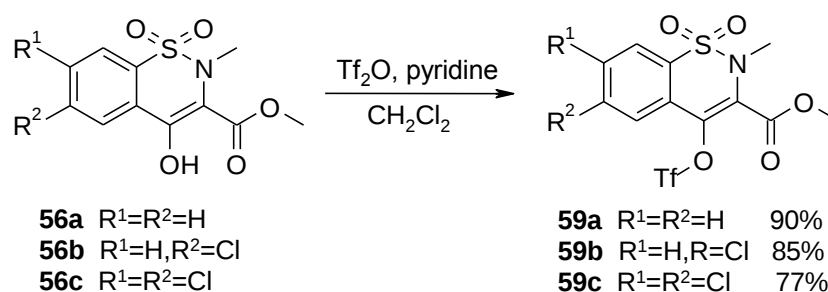


Figure 24. Benzo[e][1,2]thiazine **56** reaction with  $\text{Tf}_2\text{O}$

The main drawback of benzothiazine **59a** reduction with  $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  is the cleavage of triflyloxy group and formation of 4-hydroxybenzothiazine **56a**, that stops the reaction. To prevent this we made several experiments varying  $\text{NaBH}_4$  and  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  stoichiometry. The best product **61a** to 4-hydroxybenzothiazine **56a** ratio (2:1, respectively) was observed in the experiment with 1 equivalent of  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and 2 equivalents of  $\text{NaBH}_4$ . It is important to note that when  $\text{NaBH}_4$  is used in a large excess, or the reaction time is significantly extended, the hydrolysis of benzothiazine **60a** ester group to carboxylic acid or reduction to alcohol is observed. Taking into consideration that the structures of our interest - benzothiazines should contain at least one halogen atom, we checked how nickel boride reacts with chlorine containing compounds **59b** and **59c**. Solubility of these compounds in methanol is considerably lower, comparing to benzothiazine **59a**, which does not have halogens in phenyl ring. Reduction of triflates **59b** and **59c** with  $\text{Ni}_x\text{B}_x/\text{NaBH}_4$  gave the desired products **60b** and **60c** in 8% and 9% yield, respectively. We observed a small amount of the corresponding 4-hydroxybenzothiazine (**56b** or **56c**) in the reaction mixture. The major compounds isolated from the reaction mixture were starting triflates **59b** and **59c**. In order to increase the solubility of substrate we used MeOH/THF mixture. However with the increase

of dissolved fraction of triflate its cleavage grows giving 4-hydroxybenzothiazine (**56b** and **56c**).

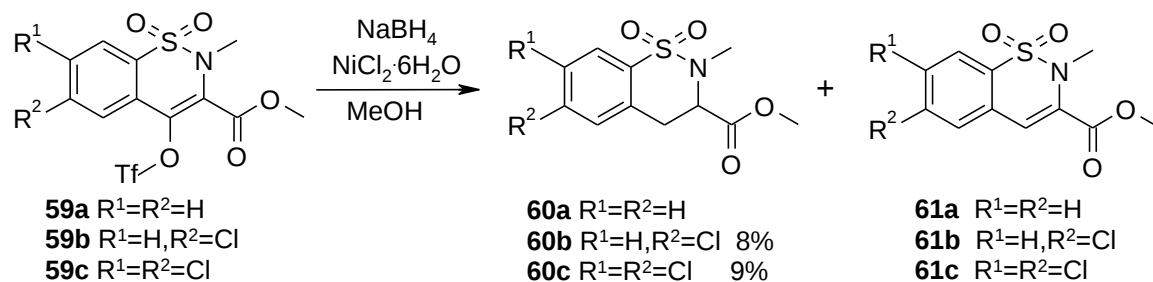


Figure 25. Reduction with  $Ni_xB_x/NaBH_4$

As an alternative for triflate **59a** reduction we used Zn/HCl method and compound **61a** was obtained in 87% yield. However in the case of 6-chloro- and 6,7-dichloro-substituted benzothiazines **59b** and **59c** we observed the formation of a mixture of corresponding saturated (**60b** or **60c**), unsaturated (**61b** or **61c**) and 4-hydroxybenzothiazines (**56b** or **56c**).

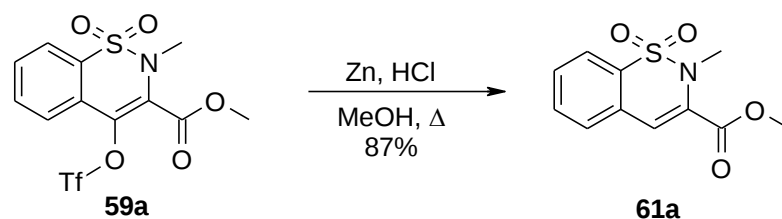


Figure 26. Reduction with Zn/HCl

In continuation of the study toward the target compound synthesis from 4-hydroxybenzothiazines we tried Pd-catalyzed hydrogen transfer hydrogenation reaction. Using DPPF as a ligand (Figure 27), we obtained expected benzothiazines **61** in high yields.

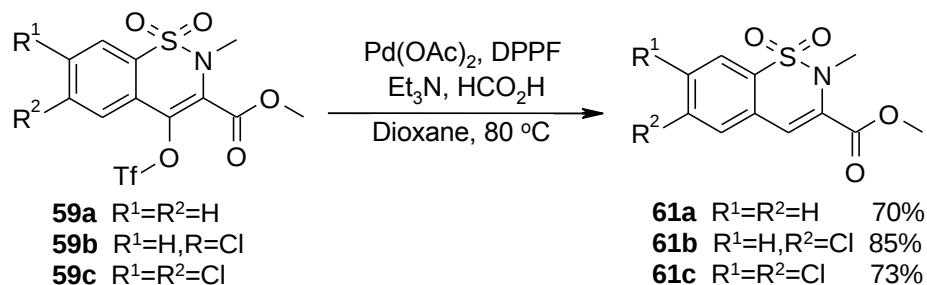


Figure 27. Benzothiazine **59** deoxygenation

Reduction of compound **61b** with NaBH<sub>4</sub> and nickel boride gave 3,4-dihydrobenzothiazine **60b** in 41% yield. Dehalogenated derivative **60a** formed as a byproduct of the reaction.

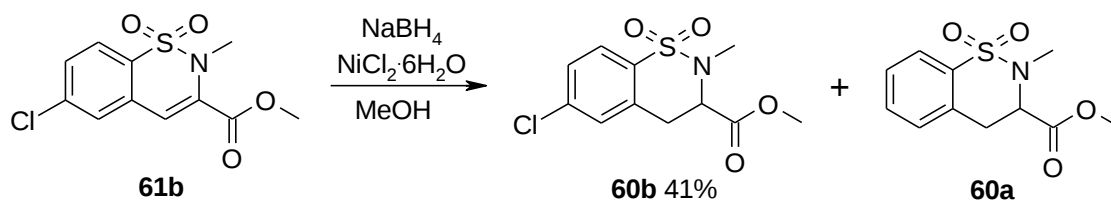


Figure 28. 3,4-Dihydrobenzothiazine **60b** synthesis

The main drawback of benzothiazine **59** reduction with Ni<sub>x</sub>B<sub>x</sub> and NaBH<sub>4</sub> is the formation of 4-hydroxybenzothiazine, thus not allowing the reaction to proceed to full conversion. An alternative route toward 3,4-dihydrobenzothiazines is Pd-catalyzed hydrogen transfer hydrogenation of corresponding triflates, that is followed by the reduction of C3-C4 double bond of isolated benzothiazine with Ni<sub>x</sub>B<sub>x</sub> and NaBH<sub>4</sub>. Unfortunately, in the case of chlorosubstituted compounds application of this method leads to partial dehalogenation.

## 5. GlyB *in vitro* activity of 1,1-dioxo-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids

Affinity of the synthesized benzothiazine-3-carboxylic acids for the glycine binding site of NMDA receptor was determined by radioligand [<sup>3</sup>H]MDL-105.519 displacement in rat brain cell membrane preparations. Unfortunately, our first conception of benzothiadiazine **2** modification, replacing ring 4-NH with sp<sup>2</sup> CH, was unsuccessful. Only one of the 6,8-dichloro-1,1-dioxo-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids **27a** – **27c** showed moderate GlyB affinity (**27b**, K<sub>i</sub> 90 μM). The next concept, based on the development of 3,4-dihydro-2H-1,2-benzothiazine structure instead of respective 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazines appeared to be more successful and already the first prepared compound from the class **32a** showed considerable GlyB affinity (IC<sub>50</sub>~10 μM; Table 2). It is important to note that within the 3,4-dihydrobenzothiazine series, as well as in the majority of the compound series designed based on kynurenic acid model, 6-Cl atom ensures notable activity. However in contrast to the other heterocycles, introduction of another halogen atom into the 8th position of the bicycle in our series did not improve the NMDA activity. Additionally, 6-chlorobenzothiazines possess better solubility. This prompted us to continue the study mainly with 6-chlorobenzothiazine-3-carboxylic acids. In order to evaluate structure-activity relationships we synthesized compounds with different substituents in the 2nd position of benzothiazine since the optimal left – limited volume hydrophobic interaction – side has

already been identified. In addition we tested also 6,7-dichlorobenzothiazine-3-carboxylic acid, however solubility and activity of this two halogen atom containing structure **32x** proved to be considerably lower. There is a clear tendency that substituents in the 3rd position of the 2-benzyl group (both electron acceptor and electron donating) raise benzothiazine (**32c**, **32e**) GlyB affinity in comparison to benzyl ring 4th position substituents (**32b**, **32d**).

Table 2

**GlyB affinity of 3,4-dihydro-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides**

| Nr.        | Benzothiazine | Control <sup>a</sup> , % | IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> , μM | K <sub>i</sub> <sup>c</sup> , μM |
|------------|---------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| <b>32a</b> |               | 48                       |                                    |                                  |
| <b>32b</b> |               | 46                       |                                    |                                  |
| <b>32c</b> |               |                          | 3.7                                | 2.6                              |
| <b>32d</b> |               |                          | 8.9                                | 6.2                              |
| <b>32e</b> |               |                          | 2.8                                | 1.8                              |
| <b>32x</b> |               | 55                       |                                    |                                  |

a – residual [<sup>3</sup>H]MDL-105,519 radioligand in the 10 μM concentration test

b – concentration when 50% of the [<sup>3</sup>H]MDL-105,519 radioligand is displaced

c – binding to NMDA receptor at equilibrium concentration

Table 3

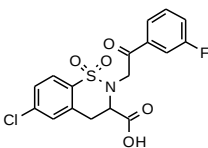
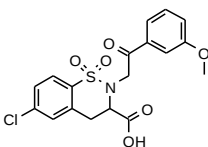
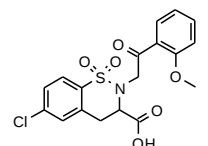
**GlyB affinity of 3,4-dihydrobenzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides**

| Nr.        | Benzo]thiazine | Control, % | Nr.        | Benzothiazine | Control, % |
|------------|----------------|------------|------------|---------------|------------|
| <b>32l</b> |                | 38         | <b>32p</b> |               | 64         |
| <b>32m</b> |                | 71         | <b>32q</b> |               | 40         |

Inserting 2-phenethyl group instead of 2-benzyl group into the thiazine structure causes substantial drop of the GlyB activity (Table 3). Only two compounds in this series (**32l** and **32q**) at 10  $\mu\text{M}$  concentration displaced more than 50% of the radioligand. Decrease of the activity comparing to the compounds shown in Table 2 suggests that in this series phenyl group stands too far from the nitrogen atom and can not properly incorporate into the receptors hydrophobic site. However such speculation may turn wrong because of surprising increase of activity after insertion of hydrogen bond acceptor into the ethyl group (acetophenons **32v** – **32t**, Table 4). It is possible that oxo group is involved in the additional hydrogen bond forming interaction with the guanidino group of receptor's arginine residue, since both carboxy group and oxo group are in the close proximity.

Table 4

GlyB affinity of 3,4-dihydro-2H-1,2-benzothiazine oxoethyl derivatives

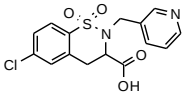
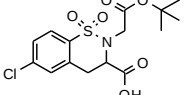
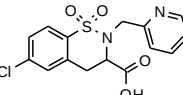
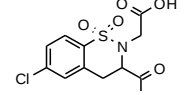
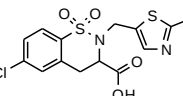
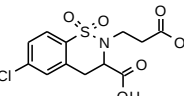
| Nr.        | Benzothiazine                                                                       | IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> , $\mu\text{M}$ | K <sub>i</sub> <sup>b</sup> , $\mu\text{M}$ |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>32v</b> |   | 7.2                                           | 5.0                                         |
| <b>32s</b> |  | 1.5                                           | 1.1                                         |
| <b>32t</b> |  | 2.1                                           | 1.7                                         |

Taking into consideration high activity of the phenone group containing benzothiazines, one could expect that phenyl group replacement by a heterocycle, that can act as a hydrogen bond acceptor similar to oxo group, would give active compounds. However it turned out that these benzothiazines (**32i**, **32h**, **32j**; Table 5) substantially lost binding activity in comparison to 2-benzyl substituted analogues.

In order to check whether 2-oxo group of benzothiazine 2nd position substituent has any functional importance without the phenyl group, we tested ester **32k** and carboxylic acid **62**. Although oxygen containing functional group is in the same distance from the ring nitrogen in both ester **32k** and carboxylic acid **62**, nonetheless the activity is not maintained.

Elongation of the alkyl linker (dicarboxylic acid **63**) also did not result in any activity improvement.

Table 5

| GlyB affinity of 3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides |                                                                                   |            |            |                                                                                    |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Nr.                                                                                       | Benzothiazine                                                                     | Control, % | Nr.        | Benzothiazine                                                                      | Control, % |
| <b>32i</b>                                                                                |  | 68         | <b>32k</b> |  | 82         |
| <b>32h</b>                                                                                |  | 80         | <b>62</b>  |  | 97         |
| <b>32j</b>                                                                                |  | 88         | <b>63</b>  |  | 88         |

Based on the literature data about NMDA receptor antagonist **1**, that (-)-isomer is about 500 times more potent than (+)-isomer, we expected that GlyB affinity of enantiomers of our 2-(3-bromobenzyl)-6-chloro-3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides (**43**) will differ in a similar way. It turned out that (*S*)-enantiomer of benzothiazinecarboxylic acid (**43a**) was only 10 times more active than (*R*)-enantiomer **43b**.

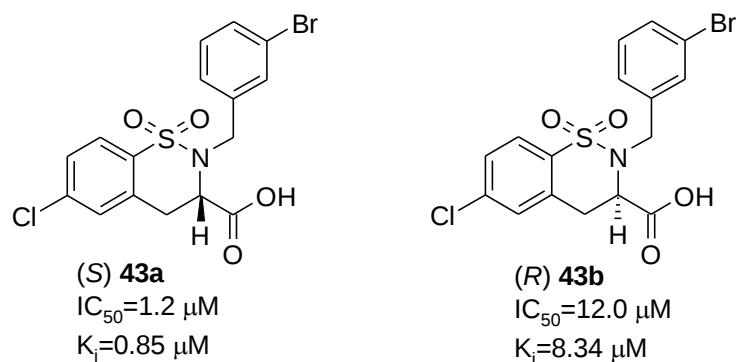


Figure 29. GlyB affinity of benzothiazinecarboxylic acid **43** enantiomers

Unfortunately, the NMDA receptor glycine binding site affinity of 3,4-dihydrobenzothiazine-3-carboxylic acids **32** and **43** appeared not sufficient to perform *in vivo* functional activity screening. Based on the results obtained one may conclude that the most attractive structures for further investigation would be 2-(2-aryl-2-oxoethyl)substituted 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids.

## CONCLUSIONS

1. A method for the synthesis of 2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides from 2-(4-methoxybenzyl)-benzo[d]isothiazol-3(2*H*)-one 1,1-dioxides has been developed, using reductive isothiazole ring opening, *N*-alkylation of obtained 2-hydroxymethylbenzenesulfonamide with ethyl bromoacetate, followed by the oxidation of hydroxymethyl group to an aldehyde group, which condenses with *N*-carbomethoxymethyl group in the presence of NaH.
2. During oxidative cyclization of 2,4-dichloro-*N*,6-dimethylbenzenesulfonamide with chromium trioxide and periodic acid the *N*-methyl group oxidation occurs forming 5,7-dichlorobenzo[d]isothiazol-3(2*H*)-one 1,1-dioxide.
3. The most appropriate *N*-protecting group for the functionalization and cyclization of 6-(hydroxymethyl)-2,4-dichlorobenzenesulfonamide is *p*-methoxybenzyl group, while *tert*-butyl group is not applicable due to the steric effect that hinders *N*-alkylation.
4. A five step enantioselective synthesis of 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides has been developed, using aryl iodide *Heck* reaction with ethyl 2-acetylaminoacrylate, followed by Rh catalyzed hydrogenation, chlorosulfonation, cyclization in the presence of NaH, and cleavage of *N*-acetyl with HCl in alcohol.
5. NaH is an appropriate base for the cyclization of methyl 2-acetylamino-3-(5-chloro-2-chlorosulfonylphenyl)-propionate enantiomers, compared to LiHMDS and DBU, which induce racemization, and DMAP showing too weak deprotonating ability.
6. An acidic hydrolysis of methyl 2-(3-bromobenzyl)-6-chloro-3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide occurs only at elevated temperature, however it induces racemization in analogy to basic hydrolysis.
7. Methyl 4-hydroxy-2-methyl-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide does not react with NaBH<sub>4</sub>/NiCl<sub>2</sub> reducing complex, however its treatment with NaBH<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> in ethyl alcohol leads to both reduction of C3-C4 double bond and the ester group.
8. Reduction of C3-C4 double bond and the ester group of methyl 4-methanesulfonyloxy-2-methyl-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide with NaBH<sub>4</sub>/NiCl<sub>2</sub> in tetrahydrofuran are independent and competitive processes.
9. Reduction of trifluoromethanesulfonyloxy group in methyl 4-trifluoromethanesulfonyloxy-2-methyl-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide occurs with high yield if 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene is used as a ligand in Pd catalyzed

hydrogen transfer hydrogenation. Method can be applied for the reduction of analogous chlorosubstituted benzothiazines.

10. GlyB affinity of the obtained 1,2-benzothiazine-3-carboxylic acids was determined in the NMDA receptor radioligand MDL-105,519 displacement assay with the following results:

- a) 2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides are inactive;
- b) 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxides show micromolar affinity;
- c) replacement of *N*-benzyl group with phenethyl- or heteroarylmethyl group in 3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxide structure results in dramatic loss of activity;
- d) introduction of an oxo group into the 2nd position of the *N*-phenethyl substituent affords compounds with micromolar GlyB affinity;
- e) (*S*)-Enantiomer of 2-(3-bromobenzyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid 1,1-dioxide is 10 times more active than its antipode.